



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR**

**ESTRATÉGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA CONTROLE DE  
MOSCA-BRANCA (*Bemisia tabaci*) E BEGOMOVIROSES EM  
TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum*)**

**CAROLINA SENHORINHO RAMALHO PIZETTA**

**BRASÍLIA, DF**

**2022**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR**

**ESTRATÉGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA CONTROLE DE  
MOSCA-BRANCA (*Bemisia tabaci*) E BEGOMOVIROSES EM  
TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum*)**

**CAROLINA SENHORINHO RAMALHO PIZETTA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Biologia Molecular.

Orientador: Francisco José Lima Aragão

**BRASÍLIA, DF**

**2022**

Esta tese intitulada “Estratégias biotecnológicas para controle de mosca-branca (*Bemisia tabaci*) e begomoviroses em tomateiro (*Solanum lycopersicum*)” foi apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do grau de Doutora em Biologia Molecular e avaliada pela banca examinadora abaixo assinada.

A transcrição ou utilização de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feito de acordo com as normas de ética científica.

Tese avaliada em: 23/09/2022

### **Banca Examinadora**

---

Dr. Francisco José Lima Aragão (Orientador)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Cenargen

---

Dr. Tatsuya Nagata

Universidade de Brasília

---

Dr. Leonardo Silva Boiteux

Embrapa Hortaliças

---

Dra. Ana Cristina Miranda Brasileiro

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Cenargen

---

Dra. Thaís de Moura Cipriano (Suplente)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Cenargen

## RESUMO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das principais hortaliças produzidas no Brasil e no mundo, apresentando grande importância econômica, social e alimentar. A mosca-branca (*Bemisia tabaci*) e os vírus por ela transmitidos, especialmente os begomovírus, estão entre os principais problemas fitossanitários que afetam a cultura. O controle químico é a prática mais utilizada no combate à mosca-branca. No entanto, a presença de populações resistentes aos inseticidas, evidencia a necessidade de estratégias mais eficazes de controle deste inseto-vetor e das begomoviroses. Neste contexto, a estratégia de RNAi foi utilizada visando a obtenção de plantas de tomateiro resistentes à mosca-branca e a múltiplas begomoviroses. Explantes cotiledonares da cultivar Micro-Tom foram transformados pela linhagem EHA 105 de *Agrobacterium tumefaciens*, contendo o plasmídeo de interesse. Foram utilizados dois vetores binários possuindo o gene de seleção *nptII*: o pC2300ATPase, contendo um cassete de supressão para o silenciamento do gene *v-ATPase* de mosca-branca; e o pC2300-p4-gemini, contendo um cassete de supressão quimérico para silenciamento do gene *rep* de quatro importantes espécies de begomovírus associadas ao tomateiro. Dos explantes transformados com o pC2300ATPase, foram obtidas nove linhagens transgênicas primárias (T<sub>0</sub>), confirmadas por PCR pela detecção dos transgenes  $\Delta$ ATPase e *nptII*. A análise da progênie confirmou a presença dos transgenes na geração T<sub>1</sub>, co-segregando em proporção mendeliana 3:1. siRNAs correspondentes ao gene  $\Delta$ ATPase foram detectados por meio da análise de *Northern blot*. Três linhagens expressando siRNAs de  $\Delta$ ATPase foram desafiadas contra a mosca-branca e revelaram uma taxa de mortalidade de 57,1% na linhagem transgênica 4.4.1, enquanto no controle a mortalidade foi de 7,6%. A mortalidade das ninfas no 2º ínstar e o tempo de desenvolvimento das ninfas no 3º ínstar foi significativamente maior nas plantas transgênicas do que nas plantas do controle. Embora a atração dos insetos não tenha sido significativamente diferente entre os tratamentos, o número de ovos postos pelos insetos nas plantas transgênicas foi significativamente menor, em comparação com os controles. Análises por RT-qPCR revelaram uma diminuição do nível de expressão do gene endógeno *v-ATPase* em moscas-brancas que se alimentaram de plantas transgênicas. Nenhum efeito inesperado foi observado sobre os insetos não-alvo *Myzus persicae* ou *Tuta absoluta*. Dos explantes transformados com o pC2300-p4-gemini, foram obtidas duas plantas transgênicas primárias (T<sub>0</sub>), confirmadas por PCR, pela detecção do transgene *p4Gemini*. Análise da progênie confirmou a presença do inserto na geração T<sub>1</sub>, segregando em proporção mendeliana 3:1. As plantas transgênicas da geração T<sub>1</sub> foram desafiadas com o agente viral TMoLCV, das quais duas plantas da linhagem L1.4 e uma planta da linhagem L1.5 apresentaram fenótipo de resistência ao vírus, sem detecção do DNA viral após 30 dias da inoculação.

Palavras-chave: RNAi, Micro-Tom, *Agrobacterium*, siRNA, ATPase, *Myzus persicae*, *Tuta absoluta*, *rep*, begomovírus.

## ABSTRACT

Tomato (*Solanum lycopersicum L.*) is one of the main vegetables produced in Brazil and the world, with great economic, social, and food importance. Whitefly (*Bemisia tabaci*) and whitefly-transmitted viruses, especially the begomovirus, are among the main phytosanitary problems affecting this crop. Chemical control is the most used practice to combat the whitefly. However, the presence of insecticide-resistant populations highlights the need for more effective strategies to control this insect vector and begomoviruses. In this context, the RNAi strategy was used to obtain tomato plants resistant to whitefly and multiple begomoviruses. Cotyledonal explants from cultivar Micro-Tom were transformed via *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105, containing the plasmid of interest. Two binary vectors containing the *nptII* selection gene were used: pC2300ATPase, containing a suppression cassette for silencing *v-ATPase* gene of whitefly; and pC2300-p4-gemini, containing a chimeric suppression for silencing the *rep* gene of four important tomato-associated begomovirus species. From the explants transformed with pC2300ATPase, nine primary transgenic lines (T<sub>0</sub>) were obtained, confirmed by PCR by detection of both  $\Delta$ ATPase and *nptII* transgenes. Progeny analysis confirmed the presence of both transgenes in the T<sub>1</sub> generation, co-segregating in Mendelian proportion 3:1. siRNAs corresponding to the  $\Delta$ ATPase gene were detected by Northern blot analysis. Three lines expressing  $\Delta$ ATPase siRNAs were challenged against whitefly and revealed a mortality rate of 57.1% in transgenic line 4.4.1, while in the control the mortality was 7.6%. Mortality of 2<sup>nd</sup> instar nymphs and the development of 3<sup>rd</sup> instar nymphs was significantly higher in the transgenic plants than in the control plants. Although the attraction of insects was not significantly different between treatments, the number of eggs laid by the insects on the transgenic plants was significantly lower, compared to the controls. RT-qPCR revealed a decreased expression level of endogenous *v-ATPase* gene in whiteflies feeding on transgenic plants. No unexpected effect was observed on the non-target insects *Myzus persicae* or *Tuta absoluta*. From explants transformed with pC2300-p4-gemini, two transgenic plants were obtained, confirmed by PCR by detection of the  $\Delta$ p4Gemini transgene. Progeny analysis confirmed the presence of the insert in the T<sub>1</sub> generation, segregating in mendelian proportion 3:1. Transgenic plants of the T<sub>1</sub> generation were challenged with the TMoLCV viral agent, of which two plants L1.4 and one plant L1.5 showed a virus resistance phenotype, without detection of viral DNA after 30 days of inoculation.

Key words: RNAi, Micro-Tom, *Agrobacterium*, siRNA, ATPase, *Myzus persicae*, *Tuta absoluta*, *rep*, begomovirus.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	9
1.1 Tomateiro ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.)	9
1.2 Mosca-branca ( <i>Bemisia tabaci</i> )	10
1.2.1 Classificação	10
1.2.2 Descrição morfológica	11
1.2.3 Reprodução e ciclo de vida	12
1.2.4 Dispersão geográfica e histórico	13
1.2.5 Danos causados à agricultura e impacto na cultura do tomateiro	14
1.3. Família <i>Geminiviridae</i>	15
1.3.1 O gênero <i>Begomovirus</i>	18
1.3.1.1 Begomovírus na cultura do tomate	22
1.4 Medidas de controle de begomoviroses e mosca-branca	24
1.5 RNA interferente	28
1.5.1 RNAi no controle de insetos	29
1.5.1.1 ATPase vacuolar H <sup>+</sup>	31
1.5.2 RNAi no controle de viroses	33
1.5.2.1 Proteína Rep	33
1.6 Transformação genética do tomateiro	35
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	36
<b>3. OBJETIVOS</b>	38
3.1 Objetivo geral	38
3.2 Objetivos específicos	38
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	38
4.1 Vetores	38
4.1.1 pCAMBIA 2300ATPase	39
4.1.2 pCAMBIA 2300-p4-gemini	40
4.2 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa EHA-105	41
4.3 Transformação genética de tomateiro via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	42
4.4 Análises das plantas transformadas	44
4.4.1 Extração de DNA e PCR	44
4.4.2 Ensaio de fluxo lateral	45
4.4.3 Análise das progênies	45
4.4.4 Análises de siRNAs	46

4.5 Ensaio com mosca-branca realizados em tomateiros transformados para expressar siRNAs de <i>ΔATPase</i> .....	46
4.5.1 Cultura de moscas-brancas .....	46
4.5.2 Análise de mortalidade das moscas-brancas .....	47
4.5.3 Análise de desenvolvimento das moscas-brancas .....	48
4.5.4 Análise de atratividade e preferência para oviposição .....	48
4.5.5 Ensaio em casa de vegetação.....	49
4.5.6 RT-PCR quantitativa (RT- qPCR).....	50
4.6 Análises em organismos não-alvo .....	50
4.6.1 Análise <i>in silico</i> de sequências do gene <i>v-ATPase</i> .....	50
4.6.2 Ensaio com <i>Myzus persicae</i> .....	51
4.6.3 Ensaio com <i>Tuta absoluta</i> .....	51
4.6.3.1 Ensaio com <i>T. absoluta</i> em folhas destacadas de tomateiro .....	51
4.6.3.2 Ensaio com <i>T. absoluta</i> em plantas de tomate.....	52
4.7 Desafio com tomateiros transgênicos transformados para expressar siRNAs de <i>Δp4Gemini</i> .....	52
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	54
5.1 Linhagens transgênicas obtidas da transformação via <i>Agrobacterium</i> com o vetor pC2300ATPase.....	54
5.1.1 Análise das progênies .....	56
5.1.2 Análise de siRNAs .....	57
5.1.3 Análise de mortalidade de moscas-brancas .....	58
5.1.4 RT-PCR quantitativa (RT- qPCR).....	60
5.1.5 Análise de desenvolvimento das moscas-brancas .....	61
5.1.6 Análise de atratividade e preferência para oviposição .....	62
5.1.7 Ensaio em casa de vegetação .....	64
5.1.8 Análises em organismos não-alvo .....	65
5.1.8.1 Análise <i>in silico</i> de sequências do gene <i>v-ATPase</i> .....	65
5.1.8.2 Ensaio com <i>Myzus persicae</i> .....	66
5.1.8.3 Ensaio com <i>Tuta absoluta</i> .....	66
5.1.8.3.1 Ensaio com <i>T. absoluta</i> em folhas destacadas de tomateiro .....	66
5.1.8.3.2 Ensaio com <i>T. absoluta</i> em plantas de tomate.....	67
5.2 Linhagens transgênicas obtidas da transformação via <i>Agrobacterium</i> com o vetor pCAMBIA 2300-p4-gemini .....	69

5.2.1 Análise das progênies .....	69
5.2.2 Desafio com tomateiros transgênicos transformados para expressar siRNAs de <i>Δp4Gemini</i> .....	70
<b>6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>72</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>73</b>



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma planta dicotiledônea da família Solanaceae, diploide ( $2n=2x=24$ ) e predominantemente autógama, apresentando baixa taxa de polinização cruzada (ALVARENGA, 2004).

As espécies silvestres são originárias da região Andina da América do Sul, tendo como centro de origem regiões do norte do Chile, Peru, Equador e Ilhas Galápagos (GIORDANO; RIBEIRO, 2000a; ALVARENGA, 2004; BOITEUX et al., 2012a; DARWIN et al., 2003). Entretanto, o centro de domesticação do tomateiro foi o México, provavelmente a partir da variedade ancestral semi-domesticada *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*, conhecida como tomate cereja (STEVENS, 2012; BOITEUX et al., 2012a).

A produção de tomate apresenta grande importância econômica, sendo considerada uma das principais hortaliças comercializadas mundialmente, com uma produção global estimada em 180 milhões de toneladas (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAOSTAT, 2019, <http://www.fao.org/faostat/>). O maior produtor mundial é a China, seguido EUA, Índia, Turquia, Egito, Itália, Irã e Espanha. O Brasil ocupa o nono lugar na produção mundial, com produção anual de aproximadamente quatro milhões de toneladas (FAOSTAT, 2019). De acordo com os dados do Levantamento Sistemático da Produção Agrícola do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - LSPA/IBGE (2019), a produção total da safra de 2019 no Brasil foi de 4,075 milhões de toneladas (t) e a área total colhida foi de 58,088 mil hectares (ha), apresentando um rendimento médio de 70,168 t/ha, com destaque para os estados de Goiás, que representou 31,65% da produção nacional, São Paulo (21,11%) e Minas Gerais (12,84 %). A produção total está dividida em dois segmentos, o “tomate estaqueado” geralmente utilizado para o mercado de fruto *in natura*, ou seja, para consumo do fruto fresco, e o “tomate rasteiro” para o processamento industrial, usado para produção de polpas e extratos (IBGE, 2018).

Além da grande importância na economia nacional, o cultivo do tomateiro também apresenta grande importância social, devido à geração de empregos pela alta demanda de mão de obra em toda a cadeia produtiva, e importância alimentar, devido à sua composição nutricional, apresentando uma mistura equilibrada de minerais e

antioxidantes (DORAIS et al., 2008), sendo uma fonte de vitamina C, pró-vitamina A (betacaroteno) e licopeno (BOITEUX et al., 2012b).

Vários problemas fitossanitários e distúrbios fisiológicos foram relatados na cultura do tomateiro, o que eleva o custo de produção total devido à exigência de insumos, como fertilizantes e defensivos (PEREIRA-CARVALHO et al., 2014), sendo, aproximadamente, 30% do custo de produção total representado pelo controle químico (EMBRAPA, 1996). Dentre os problemas fitossanitários, destacam-se os problemas ocasionados pela mosca-branca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), que além de causar prejuízos pela sucção direta da seiva, é responsável por atuar como vetor de diversos agentes virais, com destaque para as begomoviroses, que são responsáveis por graves epidemias e danos econômicos na cultura (BYRNE; BELLOWS JUNIOR, 1991; SALGUERO, 1993; BROWN et al., 1995b; LOURO, 2004; SEAL et al., 2006; DE BARRO et al., 2011; NAVAS-CASTILHO et al., 2011; PEREIRA-CARVALHO et al., 2014).

## 1.2. Mosca-branca (*Bemisia tabaci*)

### 1.2.1 Classificação

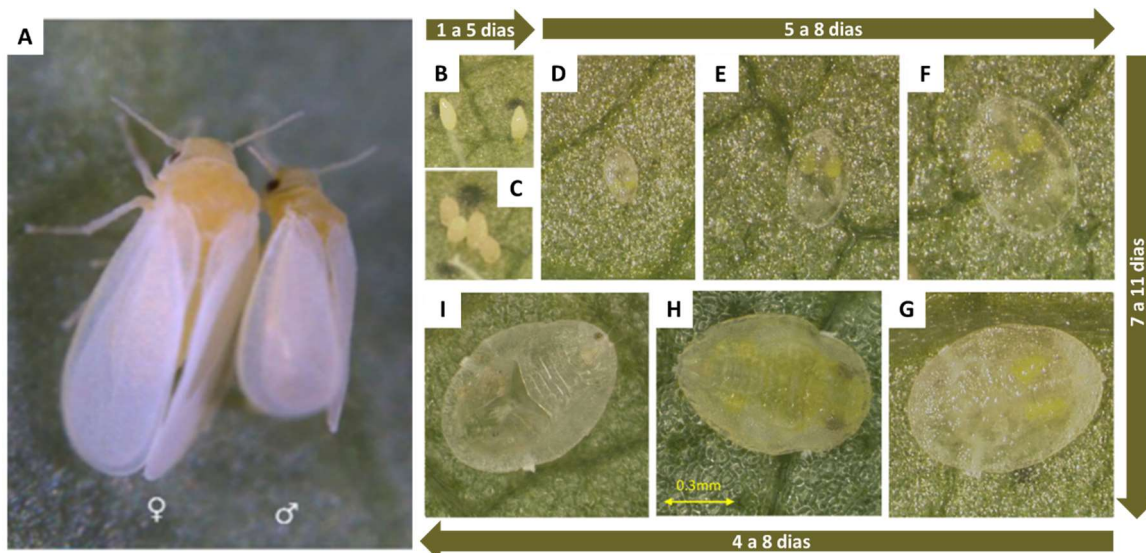
A mosca-branca é um inseto pertencente à ordem Hemiptera da família Aleyrodidae, que é composta por 161 gêneros, com 1.556 espécies (MARTIN; MOUND, 2007). *Bemisia tabaci* é a espécie que causa maiores problemas para agricultura, considerada como a mais importante e mais amplamente distribuída (HAJI et al., 2000). *B. tabaci* é considerada um complexo de espécies crípticas, composta por 11 grupos genéticos, que abrangem espécies morfológicamente indistinguíveis (DINSDALE et al., 2010; DE BARRO et al., 2011). Para distinguir os diferentes grupos de *B. tabaci* considera-se as associações com a planta hospedeira, a capacidade de dispersão, de transmissão de vírus, de adaptação às mudanças biológicas e de desenvolvimento de resistência aos inseticidas. Para definição de espécie, é considerado o sequenciamento de um segmento de 657 pares de base (pb) do gene *mitochondrial cytochrome oxidase I* (*mtCOI*), em que divergências de alinhamento acima de 3.5% definem uma nova espécie de *B. tabaci*. Atualmente, mais de 42 espécies foram identificadas (DE BARRO et al., 2011).

Dentre os grupos genéticos, destaca-se, afetando a cultura do tomateiro, as variantes do *New World/ Novo Mundo*, anteriormente classificada como biótipo A; *Middle East Asia Minor – 1/ Oriente Médio Ásia Menor 1 (MEAM1)*, anteriormente classificada como biótipo B; e *Mediterranean/ Mediterrâneo (MED)*, anteriormente classificada como Biótipo Q (PERRING et al., 2018).

### *1.2.2 Descrição morfológica*

Os adultos medem de um a dois milímetros de comprimento e apresentam dimorfismo sexual, sendo, normalmente, a fêmea maior que o macho (Figura 1A). O aparelho bucal é do tipo picador-sugador e os adultos apresentam dois pares de asas membranosas, recobertas por uma substância pulverulenta de coloração branca. Quando em repouso, as asas são mantidas levemente separadas, com os lados paralelos formando uma espécie de teto sobre o abdome, que é de coloração amarelada (Figura 1A) (HAJI et al., 2005).

As moscas-brancas apresentam metamorfose incompleta, passando do estágio ovo para ninfa (instares: I, II, III e VI) e depois para fase adulta (Figura 1). Os ovos têm o formato de pêra, coloração amarelada (Figura 1B e C) e são depositados na face inferior das folhas, presos por um pedúnculo curto. Quando os ovos estão próximos à eclosão ficam com coloração marrom. As ninfas são translúcidas de coloração amarela a amarelo-claro e apresentam aparelho bucal picador-sugador. Logo após a eclosão as ninfas, no primeiro instar (instar I), se locomovem sobre as folhas, fixam-se em um local pelo rostro e iniciam a sucção da seiva. Nos instares II e III permanecem fixadas no mesmo local e no último instar, tem a fase chamada de pupário (exúvia do último instar da ninfa) que antecede a emergência do adulto (Figura 1D a H) (HAJI et al., 2000; HAJI et al., 2005).



**Figura 1:** Ciclo de vida de *B. tabaci* (aproximadamente de 17 a 32 dias) (Fonte: Agro Bayer Brasil, <https://www.youtube.com/watch?v=7VYuHNpqrSo>). (A) Adultos de *B. tabaci*. (♀ fêmea; ♂ macho) (Fonte: CHEN et al., 2016). Estágio de ovo: (B) Ovos recém-depositados; e (C) Ovos de coloração amarelo-âmbar. Estágios ninfais: (D) 1º ínstar; (E) 2º ínstar; (F) 3º ínstar; (G) 4º ínstar; e (H) 4º ínstar - "pupa". (I) Pupa vazia após a emergência do adulto (Fonte: Adaptado de NARANJO; ELLSWORTH, 2017).

### 1.2.3 Reprodução e ciclo de vida

A reprodução pode ser sexuada ou partenogenética (sem fecundação). O acasalamento ocorre após 12 a 48 horas da emergência do adulto e várias cópulas podem acontecer durante o ciclo de vida. O potencial reprodutivo da mosca-branca depende do potencial do biótipo, nos aspectos de fecundidade, duração do ciclo biológico e razão sexual (HILJE, 1995). O desenvolvimento da mosca-branca é influenciado pelo período seco, sendo que a precipitação contribui para a redução de sua população.

A temperatura é um dos fatores que mais influenciam na duração do ciclo de vida, sendo a duração média de 19 dias a uma temperatura de 32 °C e pode chegar até 73 dias a 15 °C (SALGUERO, 1993). Sob condições favoráveis, a mosca-branca pode ter de 11 a 15 gerações por ano e as fêmeas depositar de 100 a 300 ovos durante seu ciclo de vida (BROWN; BIRD, 1992), podendo chegar a mais de 500 ovos por fêmea (NARANJO et al., 2010). Na cultura do tomateiro, Salas e Mendoza (1995) relataram um ciclo de aproximadamente 22,3 dias, do ovo a fase adulta sob condições de 65% de umidade e 25 °C de temperatura.

#### 1.2.4 Dispersão geográfica e histórico

O provável centro de origem da *B. tabaci* é no Oriente, tendo sido introduzida na Europa, África, Ásia, América Central (Panamá, Costa Rica, Nicarágua, República Dominicana, Guatemala, El Salvador, Cuba e Honduras), América do Sul (Brasil, Argentina, Colômbia e Venezuela) e América do Norte (bacia do Caribe) pelo transporte de plantas ornamentais (BROWN et al., 1995a). Atualmente, as espécies de mosca-branca já estão distribuídas mundialmente em áreas tropicais, subtropicais e temperadas, e são responsáveis por causar prejuízos em várias culturas de importância econômica, devido à sua capacidade de adaptar-se a diversos hospedeiros e condições climáticas (BROWN, 1993; SALGUERO, 1993).

No Brasil, os primeiros relatos da *B. tabaci* foram feitos em 1923 (Bondar, 1928). No final da década de 1960, diversos vírus transmitidos pela mosca-branca já tinham sido identificados, mas todos considerados como causadores de doenças secundárias, sem importância econômica, em razão da baixa incidência com que ocorriam nas culturas (COSTA, 1975).

Em 1968, foi relatada a ocorrência de mosca-branca em algodão por Costa et al. (1973) e em 1972 foram relatadas populações elevadas de *B. tabaci* em algumas regiões do norte do Paraná e no sul de São Paulo nas culturas de soja, feijão, algodão, girassol e outras. Em 1975, também foi observada infestações de mosca-branca no norte do Estado de São Paulo, em culturas de soja e algodão. Com o aumento da população da mosca-branca foi observado um aumento na incidência de doenças causadas por geminivírus em algumas culturas, com destaque ao cultivo do feijoeiro com alta incidência do vírus do mosaico dourado (bean golden mosaic virus - BGMV) (ATSUSHI, 2001).

No início da década de 1990, foram constatados surtos elevados de mosca-branca no Sudeste (São Paulo e Minas Gerais), Centro-Oeste (Goiás e Distrito Federal) e Nordeste (Pernambuco, Bahia, Rio Grande do Norte, Ceará, Piauí e Paraíba), causando um aumento na incidência de begomovirose e, conseqüentemente, prejuízos em diversas culturas de importância econômica. O rápido aumento da população de mosca-branca na olericultura e em culturas ornamentais levou à identificação da variante MEAM1, anteriormente denominada como biótipo B (MELO, 1992; LOURENÇÃO; NAGAI, 1994).

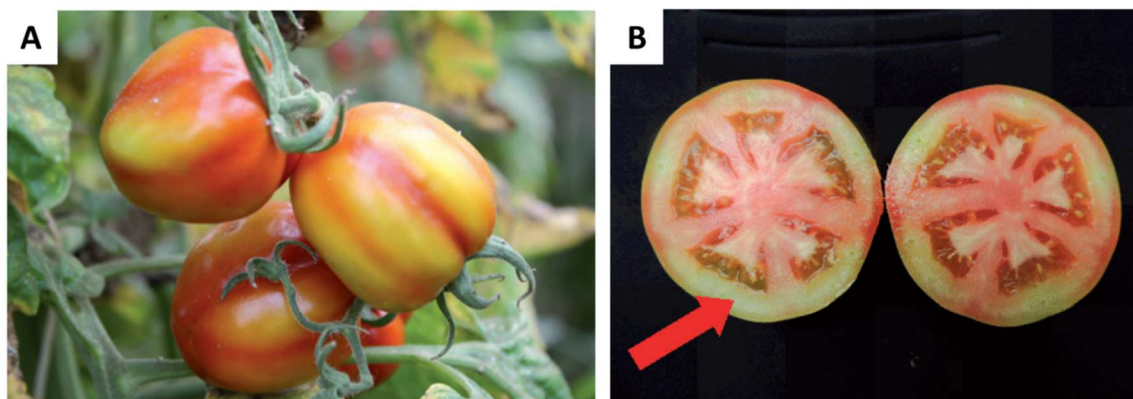
Em 1993, no Distrito Federal os primeiros surtos com o MEAM1/biótipo B se deram na cultura de tomate industrial e pepino (FRANÇA et al., 1996), e em Barreiras/BA no feijoeiro. Na região Nordeste do Brasil, no final de 1995, foram constatados altos níveis populacionais da mosca-branca em hortaliças, fruteiras e plantas daninhas no Submédio do Vale do São Francisco, sendo que em 1996 a maioria dos estados do Nordeste tinha infestações ocasionando danos econômicos (HAJI et al., 1996a; HAJI et al., 1996b; HAJI et al., 1997; HAJI et al., 2000).

#### *1.2.5 Danos causados à agricultura e impacto na cultura do tomateiro*

A mosca-branca é responsável por causar grandes danos à agricultura por possuir desenvolvimento rápido e ser adaptada aos diversos hospedeiros, colonizando mais de 900 espécies de plantas, incluindo algumas das famílias cucurbitáceas (abóbora, pepino, melancia e melão), solanáceas (tomate, pimentão e berinjela), brássicas (couve), fabáceas (soja e feijão), euforbiáceas (mandioca, leiteiro e marmeleiro), malváceas (algodão) e asteráceas (alface e crisântemo) (FERREIRA; AVIDOS, 1998; OLIVEIRA et al., 2001, GREATHEAD, 1986; HAJI et al., 2004; LI et al., 2011; SHAH; LIU, 2013; MCKENZIE et al., 2014).

Estes insetos podem causar danos diretos pela sucção da seiva, na parte abaxial das folhas, e pela injeção de toxinas e substâncias açucaradas responsáveis por reduzir a turgescência das plantas e favorecer à colonização de fungos Ascomicetos nas folhas, conhecido como fumagina ou bolor fuliginoso. Como consequência, observam-se reduções tanto na capacidade fotossintética, quanto na produção e na qualidade dos frutos (BYRNE; BELLOWS JUNIOR, 1991; PERRING et al., 2018).

Na cultura do tomateiro, os danos causados nos frutos são evidenciados por anomalias ou desordens fitotóxicas, caracterizadas pelo amadurecimento irregular (Figura 2), dificultando o ponto de colheita e reduzindo a qualidade da pasta, no caso do tomate para indústria (LOURENÇÃO; NAGAI, 1994; MOURA et al., 2014), e pela isoporização dos frutos (Figura 2B), que ficam com aspecto esponjoso e esbranquiçado internamente (HAJI et al., 1996a; VILLAS BÔAS; CASTELO BRANCO, 2009; MICHEREFF FILHO; INOUE-NAGATA, 2015).



**Figura 2:** Danos em frutos de tomate ocasionado pela mosca branca. (A) Amadurecimento irregular nos frutos (Fonte: MOURA et al., 2014). (B) Fruto de tomate com amadurecimento desuniforme e isoporização da polpa. Seta indica a área do fruto com amadurecimento tardio (Fonte: MICHEREFF FILHO; INOUE-NAGATA, 2015).

Além dos danos diretos, a infestação de mosca-branca pode causar danos indiretos pela transmissão de diversos agentes virais, pertencentes aos gêneros *Begomovirus* (Família *Geminiviridae*), *Crinivirus* (Família *Closteroviridae*), *Ipomovirus* (Família *Potyviridae*), *Torradovirus* (Família *Secoviridae*), *Carlavirus* (Família *Betaflexiviridae*), *Polerovirus* (Família *Luteoviridae*) e *Cytorhabdovirus* (Família *Rhabdoviridae*) (JONES, 2003; NAVAS-CASTILLO et al., 2011; GHOSH; GHANIM, 2021).

Dentre os danos causados à cultura do tomateiro, o principal problema está relacionado ao fato da mosca-branca atuar como vetor de diferentes gêneros virais, com destaque para espécies do gênero *Begomovirus*, pertencentes à família *Geminiviridae* (BROWN et al., 1995b; SEAL et al., 2006; DE BARRO et al., 2011).

### 1.3. Família *Geminiviridae*

A família *Geminiviridae*, considerada uma das maiores entre as famílias de vírus que infectam plantas, são responsáveis por causar grandes danos em diversas culturas de importância econômica, infectando tanto plantas monocotiledôneas, como o milho, e dicotiledônias, como tomate, pimenta, feijão, algodão, mandioca, abóbora e quiabo (RUHEL; CHAKRABORTY, 2019). Esses vírus causam grandes prejuízos na maioria das regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo também encontrados em regiões temperadas (MOFFAT, 1999; VARSANI et al., 2014; ZERBINI et al., 2017; KUMAR, 2019).

Os vírus desta família são constituídos por um (monopartidos) ou dois (bipartidos) componentes genômicos de DNA circular de fita simples (ssDNA circular). Cada cópia de ssDNA circular, variando de 2,5 a 3,2 Kb, é encapsidada em uma partícula viral geminada formada por dois icosaedros incompletos, compostos por 22 capsômeros pentaméricos. Para genomas bipartidos são necessárias dois virions, contendo os dois componentes genômicos diferentes (DNA-A e DNA-B), totalizando cerca de 5,2 Kb, para obter a infecção completa (HAMILTON et al., 1983; JESKE, 2009; BROWN et al., 2012; HESKETH et al., 2018; FIALLO-OLIVÉ et al., 2021).

O pequeno genoma dos geminivírus tem uma capacidade de codificação limitada, e depende da interação com a maquinaria celular da planta hospedeira para a replicação do DNA genômico, estabelecimento da infecção e dispersão, pois esses não codificam uma DNA polimerase, sendo transcritos pelo replicossomo do hospedeiro, formado pela RNA polimerase e os demais fatores associados (JESKE, 2009; BROWN et al., 2012; HANLEY-BOWDOIN et al., 2013; KUMAR, 2019). A transcrição inicia dentro da região intergênica (IR) ou região intergênica grande (LIR) do genoma, que contém o centro de origem da replicação (*ori*) e promotores em ambas as direções (sentido viral e complementar), que permitem a transcrição bidirecional do genoma (JESKE, 2009; BROWN et al., 2012). A replicação do DNA ocorre no núcleo das células vegetais infectadas, por meio dos mecanismos de replicação por círculo rolante (*rolling circle replicaton*) e de recombinação dependente (*recombination-dependent*) (JESKE et al., 2001; JESKE, 2009; HANLEY-BOWDOIN et al., 2013; ZERBINI et al., 2017).

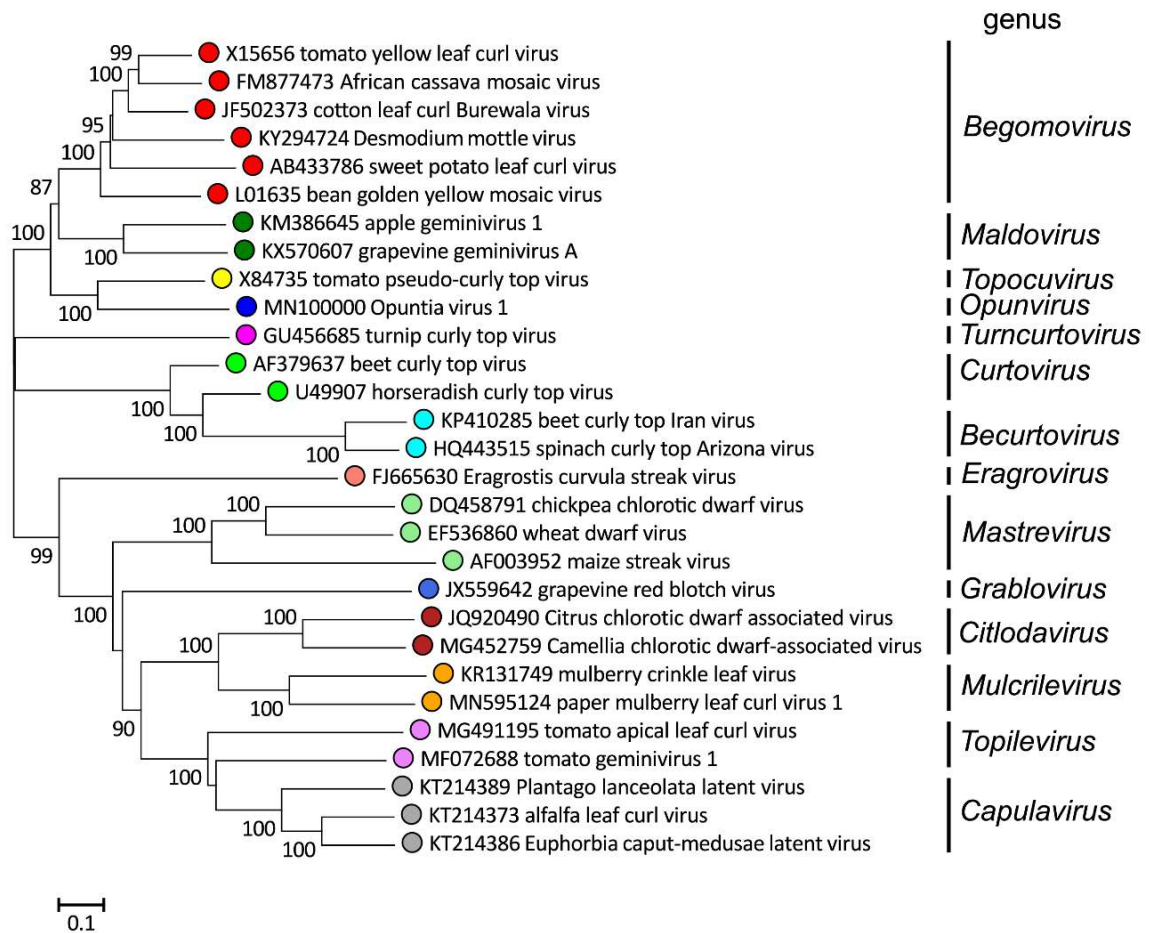
Ao todo, o genoma do geminivírus codifica de cinco a sete proteínas, que variam de acordo com os quadros de leitura (*Open Reading Frames – ORFs*) dos diferentes gêneros (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999; HANLEY-BOWDOIN et al., 2013). Essas proteínas, resultantes da transcrição bidirecional, estão envolvidas na replicação viral, na movimentação, na transmissão e na patogênese do vírus (BROWN et al., 2012; HANLEY-BOWDOIN et al., 2013).

A interação destes vírus com a maquinaria celular da planta permite a reprogramação do ciclo celular e dos controles transcricionais, alterando os padrões de expressão, inibindo vias de morte celular, interferindo na sinalização celular e na renovação das proteínas, que podem resultar na supressão das vias de defesas do hospedeiro (HANLEY-BOWDOIN et al., 2013).



A maioria das doenças causadas por agentes virais da família *Geminiviridae* estão associadas às células do floema e, desta forma, são dificilmente transmitidas por inoculação mecânica, sendo transmitidas por insetos vetores como moscas-brancas, cigarrinhas, pulgões e *treehoppers* (JESKE, 2009; ZERBINI et al., 2017). A especificidade do vetor está relacionada com a capa proteica (CP), uma proteína multifuncional que, além de fornecer a especificidade do vetor, protege o DNA durante a transmissão do vetor e está envolvida na transferência nuclear, transporte intracelular e tráfico à longas distâncias nas plantas (BRIDDON et al., 1990; JESKE, 2009).

Atualmente, de acordo com o ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) ([https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/ssdna-viruses/w/geminiviridae#Citation](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ssdna-viruses/w/geminiviridae#Citation)), os geminivírus são classificados em 14 gêneros: (*Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Citlodavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Maldovirus*, *Mastrevirus*, *Mulcrilevirus*, *Opunvirus*, *Topilevirus*, *Topocuvirus* e *Turncurtovirus*) (Figura 3); baseados na organização genômica, nas plantas hospedeiras (monocotiledôneas e dicotiledôneas), nos insetos vetores e nas relações filogenéticas; contendo ao todo 520 espécies. Dentre esses, apenas o gênero *Begomovirus* é composto por genomas monopartidos ou bipartidos, sendo os demais compostos por genomas monopartidos.

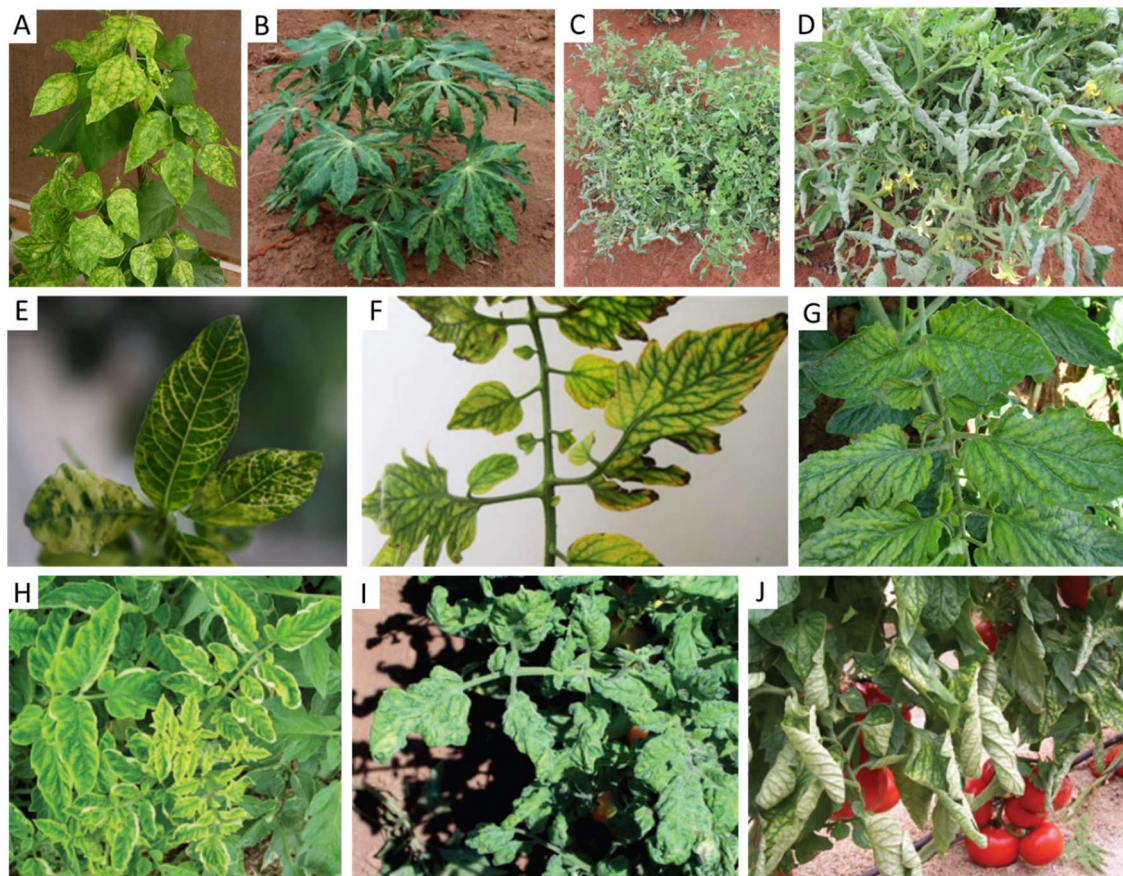


**Figura 3:** Árvore filogenética, das sequências completas do genoma ou sequências de DNA-A para geminivírus bipartidos, dos isolados representativos dos gêneros da família *Geminiviridae*. (Fonte: FIALLO-OLIVÉ et al., 2021).

### 1.3.1 O gênero *Begomovirus*

O gênero *Begomovirus* é o maior gênero da família *Geminiviridae*, também, considerado como o maior gênero de vírus de plantas em relação ao número de espécies, sendo composto, atualmente, por 445 espécies, de acordo com o ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) ([https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/ssdna-viruses/w/geminiviridae#Citation](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ssdna-viruses/w/geminiviridae#Citation)). As espécies de begomovírus são capazes de infectar uma ampla gama de plantas dicotiledôneas de elevada importância econômica, sendo responsáveis por grandes perdas na maioria dos países tropicais e subtropicais do mundo (NAVAS-CASTILHO et al., 2011; ZERBINI et al., 2017; FIALLO-OLIVÉ et al., 2021).

Plantas infectadas com begomovírus geralmente apresentam sintomas como manchas amareladas nas folhas, mosaico e/ou mosqueado, amarelecimento e clorose nerval ou internerval, nanismo/atrofiamento, epinastia/distorção e enrugamento/encarquilhamento foliar (Figura 4) (INOUE-NAGATA et al., 2016; PEREIRA-CARVALHO et al., 2014). A severidade e expressão dos sintomas podem variar de acordo com estágio de desenvolvimento e genética da planta hospedeira, fatores ambientais, características do isolado viral, e devido à ocorrência de infecções mistas (FARIA et al., 2000).



**Figura 4:** Sintomas de begomovirose: (A) Planta de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) infectada por bean golden mosaic virus (BGMV), com sintoma de mosaico nas folhas; (B) Planta de mandioca (*Manihot esculenta*) infectada com african cassava mosaic virus (ACMV), com mosaico e distorção foliar; (C e D) Tomateiro com sintomas de enrolamento foliar, clorose e atrofiamento; (E) Clorose nerval em *Sida* spp.; (F e G) Clorose internerval em tomateiro; (H) Planta de tomate infectada com tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), com amarelecimento/clorose internerval, redução e enrolamento

foliar; (I) Planta de tomate infectada com tomato severe rugose virus (ToSRV), com amarelecimento, epinastia e enrugamento foliar; (J) Planta de tomate infectada com tomato chlorosis virus (ToCV), com clorose internerval. (Fontes: (A) BONFIM 2007a; (B, H, I e J) NAVAS-CASTILLO et al., 2011; (C, D e G) BERGAMIN-FILHO et al., 2016; (E e F) FAJARDO et al., 2017.

Os begomovírus, em sua maioria, são restritos ao floema, sendo transmitidos por moscas-brancas (*B. tabaci*), de maneira persistente e circulativa não-propagativa (GHANIM et al., 2001; HANSSEN et al., 2010; GHOSH; GHANIM, 2021), visto que, as partículas virais ao serem ingeridas do floema de uma planta infectada, não se restringem ao aparelho bucal, circulando no corpo do inseto, porém sem replicação viral em seus tecidos (BLUM et al., 2006; NAVAS-CASTILHO et al., 2011), com exceção do vírus tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), que é replicado nas glândulas salivares de *B. tabaci* (HE et al., 2020).

As partículas virais ao serem ingeridas circulam do estilete até o intestino, de onde são deslocadas para a hemolinfa, após algumas horas da ingestão. Da hemolinfa as partículas são transportadas para as glândulas salivares primárias (GSPs), onde são acumuladas e podem ser transmitidas durante a alimentação pelo canal salivar das moscas-brancas, que permanecem com a capacidade de infectar novas plantas por um longo período (NAVAS-CASTILHO et al., 2011; GHOSH; GHANIM, 2021).

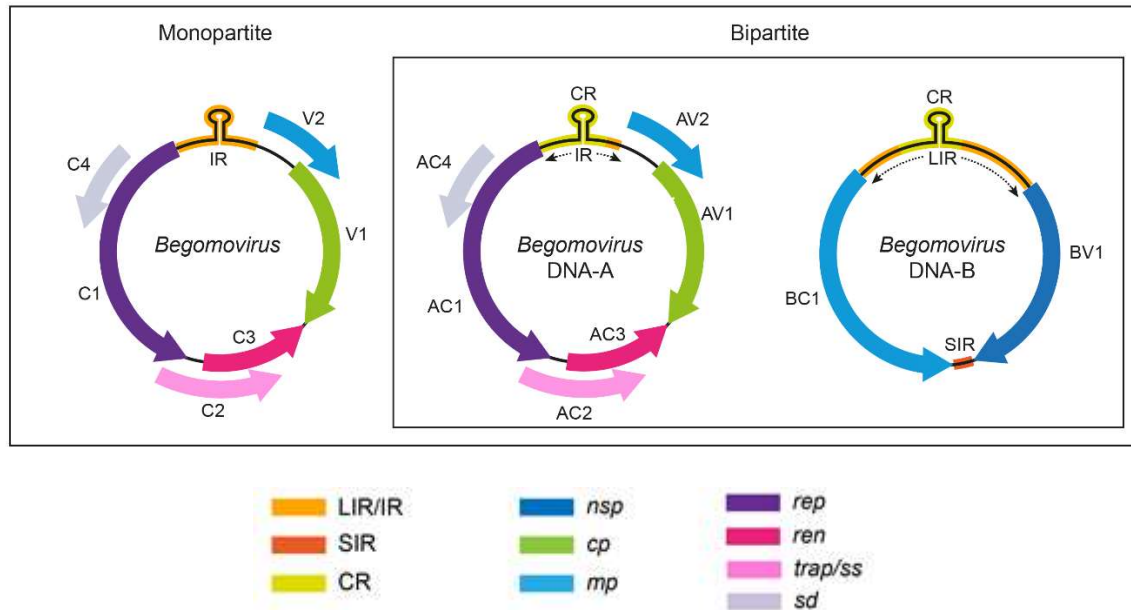
O período mínimo de acesso de aquisição (PAA) e de inoculação (PAI) dos begomovírus é de aproximadamente 10 a 20 minutos, porém períodos de aquisição mais longos aumentam a taxa de transmissão (GHANIM et al., 2001). O período de latência, considerado o período da aquisição do vírus a capacidade de transmissão para novas plantas, varia em torno de 8 a 24 horas, de acordo com a espécie de begomovírus (GHANIM et al., 2001; TOLOY et al., 2017).

No trabalho de Ghanim et al. (2001), moscas alimentando de plantas infectadas com TYLCV foram capazes de transmitir o vírus após oito horas. Já no trabalho de Toloy et al. (2017), relataram um período de latência de ToSRV em MEAM1 de 12 a 15 horas, além de observarem curtos períodos de acesso de aquisição (PAA), de um minuto., e de inoculação (PAI), de cinco minutos.

De acordo com a organização do genoma, diversidade genética e distribuição geográfica, os begomovírus foram divididos em dois grupos: os do Velho

Mundo/Hemisfério Oriental, encontrados na Europa, Ásia, África e Austrália, que são compostos por genomas monopartidos ou bipartidos; e os do grupo do Novo Mundo/Hemisfério Ocidental, encontrados nas Américas, que apresentam, em sua maioria, genomas bipartidos (NAWAZ-UL-REHMAN; FAUQUET, 2009; BROWN et al. 2012; BROWN et al., 2015), com algumas exceções.

Os genomas bipartidos possuem dois componentes genômicos, conhecidos como DNA-A e DNA-B, e os genomas monopartidos são compostos por apenas um componente genômico, homólogo ao DNA-A dos genomas bipartidos, podendo estar associados a um ssDNA circular, conhecido como alfasatélites, betasatélites e deltasatélites (NAWAZ-UL-REHMAN; FAUQUET, 2009; NAVAS-CASTILHO et al., 2011; HANLEY-BOWDOIN et al., 2013; ZERBINI et al., 2017; FIALLO-OLIVÉ et al., 2021). Os componentes genômicos (DNA-A e DNA-B) possuem uma sequência semelhante de aproximadamente 200 bases nucleotídicas dentro da região intergênica (IR), denominada Região Comum (CR), que contém o centro de origem (ori) da replicação. O DNA – A possui de cinco a seis ORFs, sendo uma ou duas ORFs no sentido viral e quatro no sentido complementar (FIALLO-OLIVÉ et al., 2021). No sentido viral a ORF V1(monopartidos)/AV1(em bipartidos) é responsável por codificar a proteína da capa proteica (CP), relacionada à encapsidação da partícula viral; e a ORF V2(monopartidos)/AV2 (presente em alguns vírus bipartidos do Velho Mundo) codifica uma proteína de movimento (MP - *Movement protein*) (BROWN et al., 2012; ZERBINI et al., 2017). No sentido complementar temos a ORF C1/AC1, responsável pela codificação da proteína iniciadora de replicação (Rep - *Replication-associated protein*); a C2/AC2 responsável pela proteína ativadora da transcrição (TrAP- *Transcriptional activator protein*); C3/ AC3 codifica a proteína que intensifica a replicação, conhecida como REn (*Replication enhancer protein*); e C4/AC4, codifica uma proteína requerida para produção de sintomas (RUHEL; CHAKRABORTY, 2019) e pode atuar também como supressora de silenciamento gênico (BROWN et al., 2012; RUHEL; CHAKRABORTY, 2019). O DNA-B codifica duas proteínas, a proteína nuclear (NSP - *Nuclear shuttle protein*), codificada a partir da ORF BV1, no sentido viral, e a proteína de movimento (MP), codificada pela BC1, no sentido complementar (Figura 5).



**Figura 5:** Organização genômica do gênero *Begomovirus*. As ORFs no sentido viral estão indicadas com a letra “V” e no sentido complementar com a letra “C”. Nos genomas bipartidos, para diferenciar os componentes genômicos, as ORFs são antecedidas pela letra A ou B. Em begomovírus do Novo Mundo, as ORFs V2 / AV2 não estão presentes. LIR, região intergênica longa; IR, região intergênica; SIR, região intergênica curta; CR, região comum; NSP, proteína nuclear; CP, proteína da capa proteica; MP, proteína do movimento; Rep, proteína iniciadora de replicação; REn, proteína intensificadora da replicação; TrAP, proteína ativadora da transcrição (Fonte: Adaptado de FIALLO-OLIVÉ et al., 2021)

### 1.3.1.1 *Begomovirus* na cultura do tomate

Em 1960, foi registrado um dos primeiros relatos de begomovírus infectando a cultura do tomateiro no Brasil (FLORES et al., 1960), sendo a transmissão associada ao biótipo A de mosca-branca (variante Novo Mundo) (BERGAMIN-FILHO et al., 2016). Inicialmente os relatos de danos econômicos causados por begomovírus em tomate eram mais dispersos, porém, desde o final da década de 80 e início da década de 90, a incidência de begomovirose aumentaram progressivamente causando perdas expressivas na maioria das áreas produtoras de tomate, como no Brasil, Flórida, México, Caribe, América Central e Venezuela (POLSTON; ANDERSON, 1997). Esse aumento foi associado à introdução do biótipo B /MEAM-1 de mosca-branca, que é altamente polífago e possui

habilidade de adaptar-se a diversas condições, favorecendo a sua rápida disseminação (FARIA et al., 2000; LOURENÇÃO; NAGAI, 1994).

O primeiro relato de begomovírus transmitido pelo biótipo B foi feito no tomateiro no Distrito Federal em 1993 por Ribeiro et al. (1994). A partir da década de 1990, foram registradas nas principais regiões de cultivo de tomate, como no Distrito Federal, São Paulo, Minas Gerais e Nordeste, infecções severas de begomovírus resultando em elevadas perdas na produção, podendo chegar a 100% (FARIA et al., 2000; GIORDANO et al., 2005a; INOUE-NAGATA et al., 2016).

Os principais sintomas no tomateiro são caracterizados pelo mosaico, mosqueado, clorose internerval, rugosidade, distorção foliar e atrofiamento (Figuras 4C; 4D; 4F a 4J) (BERGAMIN-FILHO et al., 2016; INOUE-NAGATA et al., 2016), afetando a produtividade das plantas infectadas.

Análises moleculares e filogenéticas indicam uma grande diversidade genética de begomovírus infectando tomateiros, nas principais áreas produtoras das regiões Sudeste, Nordeste e Centro Oeste, sendo relatadas 24 espécies infectando plantas de tomate no Brasil (Tabela 1) (INOUE-NAGATA et al., 2016; FIALLO-OLIVÉ et al., 2021). Dentre as quais, tomato severe rugose virus (ToSRV), e tomato mottle leaf curl virus (ToMoLCV) são predominantes e causam maiores danos na tomaticultura do país (INOUE-NAGATA et al., 2016).

**Tabela 1:** Lista de espécies de begomovírus infectando tomateiro no Brasil.

<b>Espécies de Begomovírus infectando tomateiro no Brasil</b>	<b>Abreviação</b>	<b>Isolado</b>	<b>Acesso</b>
<i>Chino del tomate Amazonas virus</i>	CdTAV	Brazil/AM10/2007	HM357461
<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i>	EuYMV	Brazil/2008	FJ619507
		Brazil/GO/Luziania 8675/2009/Goiás	JF756676
<i>Sida micrantha mosaic virus</i>	SiMMV	Brazil/A2B2	AJ557451
		BR/GO/Luziania 780/2003/Santaremensi	JX415187
<i>Sida mottle virus</i>	SiMoV/Mic	Brazil/A1B3/Micrantha	AJ557450
		Brazil/Vicosa 1/1999/Rhombifolia	AY090555
<i>Sida yellow net virus</i>	SiYNV	Brazil/RJ016/2007	KT957957.2
		Brazil/RJ028/2010	KU996357.1
<i>Tomato bright yellow mosaic virus</i>	ToBYMV	Brazil/BA167/2012	KC791690
<i>Tomato bright yellow mottle virus</i>	ToBYMoV	Brazil/TO167/2008	KC791691
<i>Tomato chlorotic leaf curl virus</i>	ToCLCV	BR-Alt1-16	MK558058
	ToCMoV/BA	Brazil/Seabra 1/1996/Bahia	AF490004
	ToCMoV	Brazil/Florestal 211/2008	KC706561
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i>	ToCMoV/MG	Brazil/Betim 1/1996/Minas Gerais	AY090557
	ToCmMV	Brazil/Coimbra 22/2007	EU710754
<i>Tomato golden leaf distortion virus</i>	ToGLDV	Brazil/TO45/2007	HM357456
<i>Tomato golden mosaic virus</i>	TGMV	Brazil/Common/1984	K02029
<i>Tomato golden vein virus</i>	TGVV	Brazil/Ita1220/2003	JF803254
<i>Tomato interveinal chlorosis virus</i>	ToICV	Brazil/Pernambuco/Mdc2681/2004	JF803252
<i>Tomato leaf curl purple vein virus</i>	ToLCPVV	BR-P793-15	KY196216
<i>Tomato leaf distortion virus</i>	ToLDV	Brazil/Paty do Alferes 4/2005	EU710749
<i>Tomato mild mosaic virus</i>	ToMMV	Brazil/Paty do Alferes 58/2005	EU710752
<i>Tomato mosaic severe dwarf virus</i>	ToMSDV	BR-DF-640 AA LVV-16	MN147863
<b><i>Tomato mottle leaf curl virus</i></b>	<b>ToMoLCV</b>	Brazil/Jaiba 13/2008	KC706615
<i>Tomato rugose mosaic virus</i>	ToRMV	Brazil/Uberlandia 1/1996	AF291705
<b><i>Tomato severe rugose virus</i></b>	<b>ToSRV</b>	Brazil/Petrolina de Goias 1/Capsicum/2003	DQ207749
<i>Tomato yellow leaf deformation dwarf virus</i>	ToYLDdDV	BR-TO 83-08	MN145942
<i>Tomato yellow spot virus</i>	ToYSV	Brazil/Bicas 2/1999	DQ336350
<i>Tomato yellow vein streak virus</i>	ToYVSV	Brazil/Potato/1983	EF417915

#### 1.4 Medidas de controle de begomoviroses e mosca-branca

O controle de doenças causadas por begomovírus é bastante difícil, e possui opções restritas. Algumas medidas de controle visam a redução das fontes de inóculo, por meio de períodos livres de plantio de determinadas culturas, uso de mudas saudáveis, e pela erradicação de plantas doentes. Porém, uma das principais medidas fitossanitárias é baseada no controle do inseto-vetor, a mosca-branca (HANSEN et al., 2010; BERGAMIN-FILHO et al., 2016).

O manejo da mosca-branca é bastante complexo e constitui um grande desafio devido à sua natureza invasora, caracterizada pela alta taxa de reprodução, extensa gama de hospedeiros, habilidade de adaptar-se às condições adversas e desenvolver resistência aos inseticidas (HAJI et al., 2000). Os danos causados pela mosca-branca podem ser minimizados por meio da adoção de controle cultural, químico e biológico. Como medida



de controle cultural, barreiras vivas podem ser utilizadas para evitar que os insetos cheguem nas plantas cultivadas. Experimento realizado na Guatemala em um plantio de tomate, utilizando como barreira plantas de sorgo, demonstrou uma redução na população das moscas-brancas e de plantas infectadas com viroses, além de evitar a perda de umidade e favorecer a produção de frutos (SALGUERO, 1993). No Brasil, barreiras vivas com sorgo e milho foram utilizadas na prevenção da infestação de *B. tabaci* no Paraná e mostraram redução de 40 e 60% na incidência de mosaico em feijão, na época inicial da floração e na época de maturação, respectivamente (IAPAR, 1984). Também podem ser utilizadas como medidas de controle cultural, o uso de plantas armadilhas, como pepino e berinjela, associadas à aplicação de inseticidas para controle da mosca-branca (HILJE, 1999).

Em relação ao controle biológico da mosca-branca, vários estudos foram baseados, principalmente, na busca de inimigos naturais. No Brasil, alguns parasitoides foram descritos e encontrados entre as populações de *Bemisia* spp., entre eles a *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae), em São Paulo e no norte do estado do Paraná; uma espécie de *Signiphora* (Hymenoptera: Signiphoridae); e sete espécies de *Encarsia*, com destaque para *Encarsia porteri* (Hymenoptera: Aphelinidae), considerada a mais comum (MENEZES JÚNIOR et al., 1996). No Submédio do Vale do São Francisco, foram registradas ocorrências do parasitoide *Encarsia lutea* (Hymenoptera: Aphelinidae); do hiperparasitoide *Signiphora aleyrodis* (Hymenoptera: Signiphoridae) (MOREIRA et al., 1999); dos predadores *Cyclonela* sp. (Coleoptera: Coccinellidae), *Orius* sp. (Hemiptera: Anthocoridae), *Chrysoperla* sp. (Neuroptera, Chrysopidae); e dos ácaros da família Phytoseiidae (HAJI et al., 2005).

O controle químico é a estratégia mais utilizada e a aplicação de inseticidas tem controlado inicialmente o inseto, entretanto a seleção de insetos resistentes tem sido um fator limitante. Outros pontos relevantes a serem considerados no uso do controle químico estão relacionados à segurança do trabalhador, à poluição ambiental e ao desequilíbrio ambiental que pode ocorrer devido ao efeito em organismos não-alvo, visto que os pesticidas geralmente utilizados são à base de neonicotinoides, juvenoides e reguladores de crescimento, que podem atingir, também, aos insetos benéficos ou não-alvos (IBRAHIM et al., 2015; INOUE-NAGATA et al., 2016; NEIVA et al., 2019). Para o controle da infestação de mosca-branca são feitas várias aplicações por ciclo da cultura, podendo ser realizadas de duas a três vezes na semana no período seco, aumentando

consideravelmente os custos na produção devido ao uso de inseticidas sistêmicos. O nível de dano econômico considerado é de um a três insetos por planta, visto que essa densidade populacional já é suficiente para causar perda total de um cultivo, devido à transmissão de vírus pela mosca-branca (IBRAHIM et al., 2015; NEIVA et al., 2019). Em um estudo a campo aberto realizado em tomateiro no Brasil, foi considerado o nível de dano econômico de quatro ninfas por folha e um adulto por bandeja de batida, com dimensões de 30 cm x 45 cm x 5 cm (GUSMÃO et al., 2006).

A dificuldade de controle e os danos causados à agricultura pelo complexo begomovírus/mosca-branca evidenciam a necessidade de desenvolvimento de estratégias de controle mais eficazes. O uso de plantas resistentes é um dos métodos mais recomendáveis para o controle de doenças e pragas, por possibilitar uma redução nos custos de produção, maior segurança e sustentabilidade, sendo de grande importância para a agricultura o desenvolvimento de plantas resistentes que apresentem características agronômicas desejáveis (QUIRINO, 1998).

O uso de cultivares que possuem genes de resistência à begomovirose é uma das estratégias utilizadas para minimizar os danos causados por esses vírus no tomateiro, sendo indispensável o uso destas em regiões com alta incidência de begomovirose (BERGAMIN-FILHO et al., 2016). São conhecidos oito genes de resistência: *Ty-1* (Acesso 'LA-1969'), *Ty-3* (Acesso 'LA-1932' e 'LA-2779'), *Ty-4* (Acesso 'LA-1932') e *Ty-6* (Acesso 'LA-2779'), derivados da espécie silvestre *S. chilense*; *Ty-2* (Acesso B6013) derivado da espécie silvestre *S. habrochaites*; *ty-5* derivado de *S. peruvianum*, caracterizada na linhagem 'TY172' do híbrido comercial 'Tyking' (ANBINDER et al., 2009; HUTTON et al., 2012; VOORBURG et al., 2020; YAN et al., 2021); *tcm-1* (*tomate chlorotic mottle virus resistance-1*), gene recessivo, derivado da linhagem 'TX-468-RG' do híbrido 'Tyking' (GIORDANO et al., 2005b; PEREIRA-CARVALHO et al., 2014); e *tgr-1* introduzido da linhagem FLA653, derivada do cruzamento entre *S. chilense* (Acesso LA 2779) e 'Tyking' (BIAN et al., 2007). Entretanto, existem relatos de quebra de resistência, incidência de infecções mistas e associação com os betasatélites, que dificultam o controle, pois o nível de resistência varia entre as espécies de begomovírus, não sendo eficaz para todas (INOUE-NAGATA et al., 2016; BUTTERBACH et al., 2014; REIS et al., 2020; YAN et al., 2021). Desta forma, é fundamental a busca de fontes que conferem amplo espectro de resistência, podendo utilizar a estratégia de piramidização

de diferentes genes de resistência para obtenção de resistência ampla e durável (VIDAVSKI et al., 2008).

Para o controle dessas fitoviroses, além do uso de cultivares que possuem gene de resistência à begomovirose, é de grande importância o desenvolvimento de variedades resistentes à mosca-branca. O uso destas plantas pode influenciar no padrão de dispersão das viroses transmitidas por estes insetos, devido à redução do tamanho e do comportamento populacional (HEINZ; ZALOM, 1995). Algumas espécies selvagens de tomateiro, como *S. pennellii*, *S. habrochaites* (var. *glabratum* e *hirsutum*), *S. pimpinellifolium*, *S. chilense*, *S. galapagense*, *S. peruvianum*, *S. cheesmaniae* e *S. chmielewskii*, apresentam características que conferem diferentes níveis de resistência à mosca-branca (FIRDAUS et al., 2012; SILVA et al., 2014; ZEIST et al., 2018). Os tricomas são estruturas epidérmicas, semelhantes à pelos, que podem influenciar no comportamento dos insetos, podendo interferir na oviposição, fixação e alimentação, sendo considerado um dos principais fatores físico-químicos relacionados à resistência aos insetos e à mosca-branca. A resistência geralmente está atrelada à densidade e, principalmente, ao tipo de tricoma, que são categorizados em glandulares e não-glandulares, sendo que os glandulares podem liberar aleloquímicos, como sesquiterpeno zingibereno (ZGB), metilcetona 2-tridecanona (2-TD) e acil-açúcares (acilglicose e acilsacarose) (NEIVA et al., 2013; SILVA et al., 2014; ZEIST et al., 2021). No entanto, muitos genes indesejáveis estão envolvidos no processo de introgressão de genes de resistência à mosca-branca provenientes de acessos selvagens, dificultando a obtenção de cultivares comerciais que permaneçam com as características desejáveis (ZEIST et al., 2021).

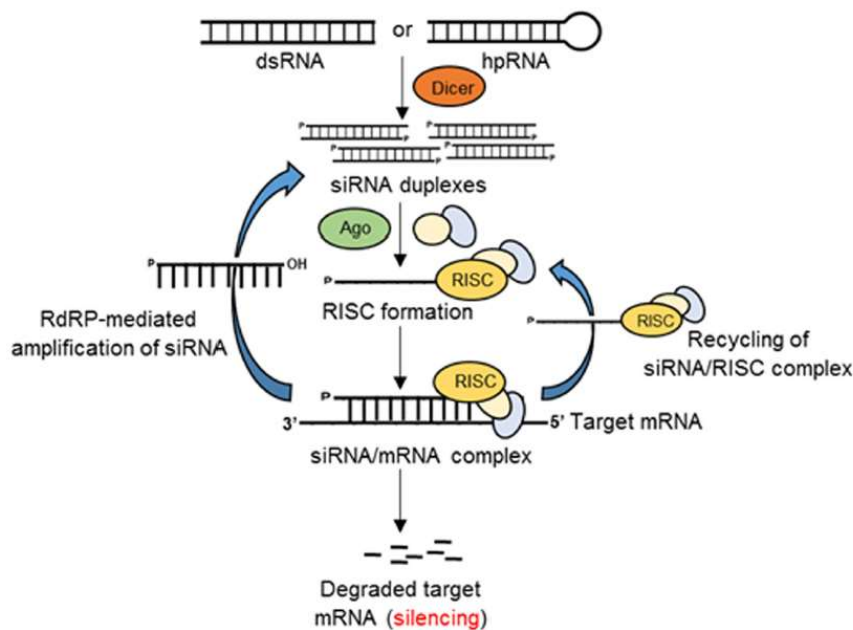
Desta forma, é de grande interesse a introdução de múltiplos genes de resistência à mosca-branca e begomovirose por meio de melhoramento convencional e pelo uso de ferramentas biotecnológicas para desenvolvimento de variedades resistentes. Uma das estratégias utilizadas é a busca e a inserção de genes até o momento indisponíveis na cultura, contribuindo para o aumento da variabilidade genética e diversificação das formas de resistência, que é de extrema importância para evitar ou retardar potenciais eventos de quebra de resistência.

### 1.5 RNA interferente

RNA interferente (RNAi) é um mecanismo de defesa natural em células eucariotas contra vírus e elementos transponíveis (OBBARD et al., 2009), que pode ser utilizado como uma estratégia promissora para obtenção de plantas resistentes e/ou tolerantes a viroses e insetos-praga (WANG et al., 2000; BONFIM et al., 2007b; ARAGÃO et al., 2013a; ARAGÃO et al., 2013b; LIU et al., 2020).

O mecanismo de RNAi (Figura 6) é ativado pela presença de dsRNAs (RNAs de fita dupla) ou hpRNAs (hairpin RNA), que são clivados, pela ação de uma endonuclease RNase III, chamada DICER, resultando em moléculas de siRNA (pequenos RNAs interferentes), de 21 a 25 nucleotídeos (ANGAJI et al., 2010). Os siRNAs, após associarem-se ao complexo ribonucleoprotéico, denominado como RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*), servirão de guia para detecção de sequências específicas, complementares ao RNA mensageiro (mRNA). Ao encontrar sequência complementar, haverá a degradação, pela ação de proteínas associadas ao complexo RISC, denominadas argonautas, ou a não-tradução, controlando a expressão gênica (KABIR et al., 2008; JINEK; DOUDNA, 2009; MAJUMDAR et al., 2017).

Em plantas, o mecanismo de RNAi pode ser amplificado pela ação de polimerases dependentes de RNA (RdRP - *RNA-dependent RNA Polymerase*), que são capazes de usar moléculas de RNA, resultantes da clivagem inicial, como substrato para gerar novas moléculas de dsRNAs, que são novamente clivadas pela DICER, gerando uma segunda geração de siRNAs (Figura 6) (SIJEN et al., 2001; BUTTERBACH et al., 2014; KHALID et al., 2017; VOORBURG et al., 2020).



**Figura 6:** Esquema do silenciamento gênico mediado por RNAi em eucariotos. RNAs dupla fita (dsRNA) ou (hpRNAs) são processados, pela ação da Dicer, em pequenos RNAs dupla fita (siRNA). Uma das fitas do siRNA (fita guia) associa-se a proteína argonauta e a outras proteínas para formar o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). O complexo de siRNA/RISC, ao encontrar sequência complementar, liga-se ao mRNA alvo, resultando na degradação ou na inibição da tradução. Os componentes do complexo de siRNA/mRNA podem ser reciclados pelo complexo RISC ou gerar siRNA secundários pela ação da polimerase dependente de RNA (RdRP). (Fonte: MAJUMDAR et al., 2017).

### 1.5.1 RNAi no controle de insetos

A tecnologia baseada em RNAi pode ser utilizada para o controle de pragas com maior especificidade, pelo silenciamento genético de genes-alvo essenciais, desencadeado pelo fornecimento de moléculas de dsRNAs exógenos via plantas transgênicas (silenciamento de gene induzido pelo hospedeiro/ *Host-Induced Gene Silencing* - HIGS) ou por meio de aplicações tópicas, tais como pulverização foliar, microinjeção, imersão radicular e tratamento de sementes (YAN et al., 2020; LIU et al., 2020).

O uso do mecanismo de RNAi foram relatados em espécies das ordens *Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Diptera*, *Hemiptera*, *Hymenoptera*, *Dictyoptera*, *Isoptera* e *Orthoptera* (SWEVERS; SMAGGHE, 2012). A eficácia do uso de RNAi para obtenção

de plantas transgênicas resistentes a insetos-praga foram relatadas no controle de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) pelo silenciamento do gene do citocromo P450 (*CYP6AE14*), responsável por permitir que a lagarta tolere concentrações inibitórias do metabólito do algodão, o gossipol (MAO et al., 2007); no controle de *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae), pelo silenciamento de alguns genes, dentre eles, genes das subunidades de v-ATPase e da  $\alpha$ -tubulina (BAUM et al., 2007); e no controle de larvas de *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae), pela supressão do gene *DvSnf7*, que resultou no desenvolvimento do produto comercial, o milho transgênico SmartStax PRO, tolerante ao herbicida glifosato e resistente à praga de raiz, devido à expressão de dsRNAs *DvSnf7* e de proteínas endógenas Cry (Cry3Bb1e Cry34Ab1/Cry35Ab1) (HEAD et al., 2017).

Também foram relatados o uso de RNAi no controle de moscas-brancas, pelo silenciamento de diversos genes-alvo. No trabalho de Luan et al. (2013), por meio de ensaios de alimentação de dsRNAs mediados por folhas, para o silenciamento de genes da via da ecdisona (*Cyp315a1*, *Cyp18a1*, *EcR* e *E75*), observaram um efeito limitado na sobrevivência e fecundidade de moscas-brancas adultas, entretanto em ninfas, verificaram um atraso no desenvolvimento e uma redução da sobrevivência. Em ensaios com moscas-brancas alimentando-se de plantas transgênicas de tabaco, observaram uma mortalidade de 70% em plantas transgênicas expressando dsRNAs para o silenciamento dos genes da aquaporina e da alfa glucosidase (RAZA et al., 2016), e uma mortalidade de 90 % em plantas expressando dsRNAs para o silenciamento dos genes acetilcolinesterase (*AChE*) e do receptor de ecdisona (*EcR*) (MALIK et al., 2016). Recentemente, relataram a obtenção de resistência em plantas transgênicas de tomate expressando dsRNAs para o silenciamento do gene *BtPMT1*, prejudicando a capacidade adquirida pela mosca-branca de neutralizar a ação tóxica de glicosídeos fenólicos, produzidos pelas plantas como mecanismo de defesa (XIA et al., 2021).

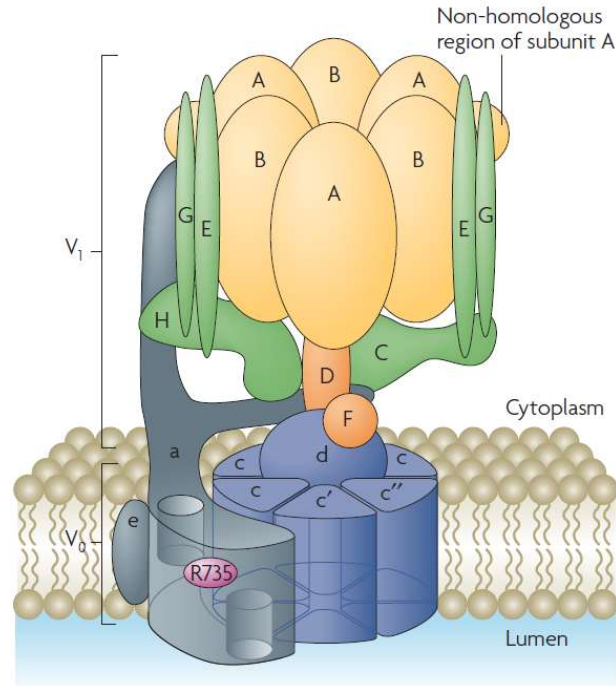
No trabalho relatado por Upadhyay et al. (2011), foram observados diferentes graus de mortalidade de moscas-brancas por meio da administração oral de siRNA e dsRNA, visando o silenciamento de cinco genes em mosca-branca: actina, ADP/ATP translocase,  $\alpha$ -tubulina, proteína ribossomal L9 e a subunidade A da v-ATPase. A administração oral de siRNAs e dsRNAs demonstrou ser eficiente no controle do inseto, com destaque para dsRNAs de v-ATPase, que resultaram em uma mortalidade de 97,5%, após seis dias de administração (UPADHYAY et al., 2011).

Trabalhos envolvendo *B. tabaci* e o silenciamento do gene *v-ATPase*, demonstraram ser eficientes no aumento da taxa de mortalidade e na alteração do ciclo da mosca-branca. Em um ensaio com moscas-brancas alimentadas a partir de discos foliares de plantas transgênicas de tabaco, expressando dsRNAs de *v-ATPase*, verificaram uma mortalidade de 34% a 85%, após seis dias de interação, e uma redução de 62% no nível de transcrição de *v-ATPase* em moscas-brancas, após oito dias de interação (THAKUR et al., 2014). Em plantas de alfaces transgênicas expressando siRNAs correspondente a um gene *v-ATPase*, foram observadas uma mortalidade de 83% a 98% de moscas-brancas adultas e uma redução de 95% no número de ovos, com consequente redução na população do inseto adulto (IBRAHIM et al., 2017). Em plantas de feijão-comum transgênica expressando siRNAs de *v-ATPase* observaram uma mortalidade de aproximadamente 60%, conferindo tolerância à planta (FERREIRA et al., 2022).

#### 1.5.1.1 *ATPase vacuolar H<sup>+</sup>*

A ATPase H<sup>+</sup> vacuolar, também conhecida como v-ATPase, é uma enzima conservada que atua como uma bomba de prótons em células eucarióticas (FINBOW; HARRISON, 1997; NELSON; HARVEY; 1999; NELSON et al., 2000). A v-ATPase está presente nas membranas de compartimentos intracelulares, tais como vesículas, lipossomas, endossomas, vacúolos, vesículas sinápticas, retículo endoplasmático, grânulos secretores e no complexo de Golgi (FINBOW; HARRISON, 1997; STEVENS; FORGAC, 1997). A sua função enzimática é conduzida pelo consumo de ATP, transformando a energia proveniente da hidrólise de ATP em diferentes potenciais eletroquímicos de prótons nas membranas biológicas pelo bombeamento de H<sup>+</sup> (BEYENBACH; WIECZOREK, 2006).

As v-ATPases possuem uma estrutura única composta de 14 subunidades de proteínas dispostas em dois complexos, designadas V0 e V1, sendo que V1 é um complexo citoplasmático que faz a mediação da hidrólise de ATP e o complexo V0 transloca o H<sup>+</sup> pela membrana (Figura 7) (BEYENBACH; WIECZOREK, 2006; FORGAC, 2007). A supressão da subunidade A do domínio V1, responsável pela hidrólise de ATP, é letal (BAUM et al., 2007; UPADHYAY et al., 2011).



**Figura 7:** Estrutura da v-ATPase. O complexo vacuolar (v-) ATPase é composto por um **domínio periférico** (V1, mostrado em amarelo e laranja), que é responsável pela hidrólise ATP, e um **domínio integral** (V0, mostrado em azul e cinza), que está envolvido na translocação de prótons através da membrana. O núcleo do domínio V1 é composto por um arranjo hexamérico de subunidades alternadas A e B, que participam da ligação e hidrólise do ATP. O domínio V0 inclui um anel de subunidades proteolípídicas (*c*, *c'* e *c''*) que são adjacentes às subunidades *a* e *e*. Os domínios V1 e V0 são conectados por um **talo central**, composto pelas subunidades D e F de V1 e subunidade *d* de V0, e por múltiplos talos periféricos, compostos pelas subunidades C, E, G, H e o Domínio N-terminal da subunidade *a* (Fonte: FORGAC, 2007).

Como as ATPases são cruciais para várias funções no metabolismo celular, principalmente pela função ligada ao transporte intracelular, essas proteínas são candidatos promissores para a obtenção de resistência à mosca-branca baseada em RNAi (BEYENBACH; WIECZOREK 2006; UPADHYAY et al., 2011; THAKUR et al., 2014; IBRAHIM et al., 2017).

Entretanto, como os genes *v-ATPase* apresentam algumas semelhanças entre as espécies de insetos, o efeito do silenciamento de genes em organismos não-alvo deve ser analisado.



### 1.5.2 RNAi no controle de viroses

O mecanismo de RNAi, também conhecido como silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS), é uma defesa antiviral natural em plantas e, também, tem sido utilizada como uma potente estratégia na geração de plantas resistentes a vírus. Uma das estratégias é a geração de plantas transformadas para expressar um cassete de interferência do tipo *intron-hairpin*, na qual sequências específicas são dispostas no sentido *sense* e *antisense*, separadas por um *intron*, para assegurar a formação de hpRNAs, que ativarão o silenciamento dos genes-alvo de maneira eficiente (SMITH et al., 2000; ARAGÃO et al., 2013a; ARAGÃO et al., 2013b; KHALID et al., 2017).

Para obtenção de resistência são escolhidos como alvo genes que desempenham funções essenciais, normalmente relacionado a replicação viral (KHALID et al., 2017; RUHEL; CHAKRABORTY, 2019). Abordagens visando o silenciamento mediado por hpRNAs, tendo como alvo a proteína Rep (C1/AC1), associada à replicação viral, demonstraram ser uma boa estratégia para obtenção de plantas resistentes ao begomovírus.

Asad et al. (2003) obtiveram plantas de tabaco transgênicas resistentes ao vírus cotton leaf curl virus (CLCuV), expressando RNAs no sentido *sense* e *antisense* com sequências de AC1, AC2 e AC3. Fuentes et al. (2006) relatou pela primeira vez resistência ao vírus tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), em plantas de tomate transformadas com uma construção de interferência para o gene da proteína C1.

Plantas de feijoeiro geneticamente modificadas, contendo esse tipo de construção de interferência, com sequências virais correspondentes ao gene *rep* (AC1), resultaram na cultivar comercial BRS FC401 RMD, altamente resistente ao bean golden mosaic virus (BGMV), mesmo sobre alta pressão do inóculo (BONFIM et al., 2007b; ARAGÃO; FARIA, 2009; ARAGÃO et al., 2013b; FARIA et al., 2016)

#### 1.5.2.1 Proteína Rep

A proteína Rep (*Replication initiator protein*), codificada no sentido complementar pela ORF C1 (monopartidos)/AC1 (bipartidos) em begomovírus (BROWN et al., 2012; RIZVI et al., 2014), é conhecida por ser o único fator viral indispensável para replicação, sendo considerada uma proteína multifuncional por desempenhar um importante papel na interação com os fatores da planta hospedeira para a modulação do ambiente celular e para a replicação viral (RIZVI et al., 2014). A Rep é responsável por catalisar o início, o alongamento e o fim da replicação por círculo rolante, atuando na

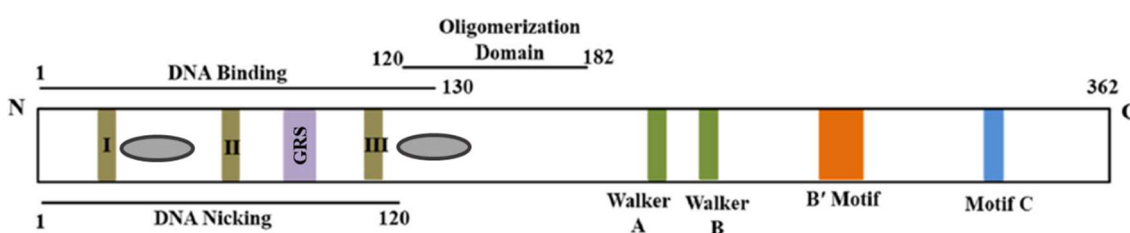
clivagem e na ligação do DNA viral (HANLEY-BOWDOIN et al., 2013; RUHEL; CHAKRABORTY, 2019). Inicialmente a Rep se liga a sítios específicos de ligação, constituído por elementos repetidos, conhecidos como *iterons*, presentes na região intergênica (RIZVI et al., 2014). Após, a replicação inicia pela clivagem do genoma viral, em uma sequência nucleotídica conservada (5' – TAATATTAC – 3'), dentro da região intergênica (LIR) (BROWN et al., 2012; RIZVI et al., 2014; ZERBINI et al., 2017), que resulta em uma extremidade 3' livre, por onde se inicia a síntese do ssDNA, com auxílio da RNA polimerase e outros fatores da planta hospedeira (HANLEY-BOWDOIN et al., 2013). A Rep é capaz de regular a sua própria expressão, atuando na regulação da transcrição e, conseqüentemente, na expressão de alguns genes virais, pois a repressão da expressão de Rep conduz uma melhora na expressão da proteína ativadora da transcrição (TrAP), que por sua vez ativa a expressão da capa protéica (CP) e da proteína de transporte nuclear (NSP) (RIZVI et al., 2014; HANLEY-BOWDOIN et al., 2013; RUHEL; CHAKRABORTY, 2019).

Estruturalmente a proteína Rep dos geminivírus possuem vários domínios (Figura 8). Os domínios de ligação (1 – 130 aminoácidos) e de clivagem (1 – 120) encontram-se na região N-terminal, que abrange os motivos conservados I, II e III e as hélices 1 e 2, que são essenciais para a ligação e clivagem do DNA (RIZVI et al., 2014; RUHEL; CHAKRABORTY, 2019). O Motivo I está relacionado à ligação específica ao dsDNA, o Motivo II é um local de interação com íons metálicos e pode estar envolvido na conformação da proteína e clivagem, e o Motivo III contém a tirosina envolvida na clivagem do DNA (NASH et al., 2011; RIZVI et al., 2014). As hélices 1 e 2, encontram-se entre os Motivos I e II, entre os aminoácidos 25 – 52, e mostraram, também, ser necessárias para que ocorra a ligação e a clivagem do DNA (OROZCO; HANLEY-BOWDOIN, 1998). As proteínas Rep também possuem um motivo altamente conservado em toda família *Geminiviridae* denominado como GRS (*Geminivirus Rep Sequence*), que se encontra entre os motivos II e III na região N terminal. A sequência GRS é essencial para que se inicie a replicação por círculo rolante, conforme visto no trabalho de Nash et al. (2011), em que os vírus com mutação na sequência GRS não foram infecciosos e não foram capazes de clivar o DNA e de replicar.

O domínio de oligomerização (120 – 182) encontra-se na região central, com uma sobreposição no domínio de ligação (RIZVI et al., 2014). A maioria das interações da Rep com os fatores celulares acontece na região desse domínio. A etapa de

oligomerização é fundamental para a replicação viral, como demonstrado no trabalho Orozco et al. (2000), visto que mutantes na região de oligomerização foram defeituosos para replicação viral.

O domínio ATPase encontra-se na região C-terminal, que abrange os motivos Walker A, Walker B, B' e C, necessários para a atividade ATPase e helicase (RIZVI et al., 2014; GEORGE et al., 2014; RUHEL; CHAKRABORTY, 2019). A atividade ATPase é necessária para a replicação viral, conforme demonstrado no trabalho Desbiez et al. (1995), em que o gene *rep* mutado para a ligação do ATP foi incapaz de suportar a replicação do DNA in vivo.



**Figura 8:** Representação esquemática da proteína Rep dos geminivírus (Fonte: RUHEL; CHAKRABORTY, 2019)

A inibição da replicação viral é uma boa estratégia para controle de viroses. O fato de a proteína Rep ser fundamental para que ocorra a replicação, reflete em alto grau de conservação estrutural e filogenética. Desta forma, a proteína Rep é considerada um dos melhores alvos para ser utilizado como estratégia na obtenção de resistência de amplo espectro para infecções causadas por geminivírus (RUHEL; CHAKRABORTY, 2019).

### 1.6 Transformação genética do tomateiro

O tomateiro é considerado uma planta modelo de transformação de plantas dicotiledôneas (MCCORMICK et al., 1986; LING et al., 1998). O primeiro relato de transformação de tomate foi feito por McCormick et al. (1986), e após vários outros trabalhos de transformação foram relatados (CHYI; PHILLIPS, 1987; FILLATTI et al., 1987; FISCHHOFF et al., 1987; DELANNAY et al., 1989; DAVIS et al., 1991a; DAVIS et al., 1991b; VAN ROEKEL et al., 1993; HAMZA;CHUPEAU,1993; PATIL, 1994; AGHARBAOUI et al., 1995; FRARY, 1995; FRARY; EARLE, 1996; LING et al., 1998;

TABAEIZADEH et al., 1999; VIDYA et al., 2000; COSTA et al., 2000; HU; PHILLIPS, 2001; PARK et al., 2003; RAJ et al., 2005; SUN et al., 2006; QIU et al., 2007).

No trabalho desenvolvido por Sun et al. (2006) foi relatado alta eficiência de transformação de tomate via *Agrobacterium*, utilizando a cultivar Micro-Tom. Esta cultivar é considerada como modelo para abordagens genômicas, por apresentar características vantajosas, tais como tamanho pequeno, ciclo curto (70 a 90 dias) e ser de fácil transformação genética (SUN et al., 2006; QIU et al., 2007).

## 2 JUSTIFICATIVA

*Bemisia tabaci* é um complexo de insetos-praga responsável por causar grandes danos à agricultura em todo o mundo, pela sucção de seiva e, principalmente, por ser vetor de diferentes vírus, com destaque para as begomoviroses, que são responsáveis por graves epidemias e danos econômicos em diversas culturas, inclusive no tomateiro. A dificuldade de controle do complexo mosca-branca/begomovírus e a manifestação de resistência da mosca-branca a inseticidas evidenciam a necessidade do desenvolvimento de estratégias mais eficazes de controle desse vetor, e dos vírus por elas transmitidos. Avanços nos estudos e o desenvolvimento de diversas técnicas moleculares possibilitaram maior entendimento dos diversos processos bioquímicos em vários organismos e como manipulá-los de forma precisa. Entre essas técnicas, o mecanismo de RNAi pode ser utilizado para obtenção de plantas resistentes a insetos-praga e a viroses (ARAGÃO et al., 2013a; ARAGÃO et al., 2013b).

O uso da estratégia de RNAi na obtenção de plantas transgênicas resistentes a insetos-praga foi demonstrada (BAUM et al., 2007; MAO et al., 2007; GORDON; WATERHOUSE 2007) e resultou no desenvolvimento do produto comercial, o milho transgênico SmartStax PRO, resistente à praga de raiz, *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae), pelo silenciamento do gene *DvSnf7*, e pela expressão das proteínas endógenas Cry3Bb1 e Cry34Ab1/Cry35Ab1 (HEAD et al., 2017).

Também foram relatados o uso da estratégia de RNAi no controle de moscas-brancas, pelo silenciamento de diversos genes-alvo (UPADHYAY et al., 2011; LUAN et al., 2013; RAZA et al., 2016; MALIK et al., 2016; XIA et al., 2021). Genes codificadores da proteína v-ATPase estão entre os alvos mais promissores, visto que são cruciais para várias funções no metabolismo celular. A estratégia do silenciamento desse gene tem sido aplicado no controle de mosca-branca, demonstrando ser eficiente no aumento da

mortalidade e impacto no ciclo de vida do inseto, em experimentos realizados em plantas de tabaco, alface e feijão (THAKUR et al., 2014; IBRAHIM et al., 2017; FERREIRA et al., 2022).

A eficácia do uso da estratégia de RNAi na obtenção de plantas resistentes à begomovírus, também já foi relatada, com destaque para estratégias envolvendo o silenciamento do gene da proteína Rep (C1/AC1), considerada o único fator viral indispensável para replicação (ASAD et al., 2003; FUENTES et al., 2006; BONFIM et al., 2007b). Um exemplo de sucesso do uso da estratégia, foi a obtenção do feijão-comum, aprovado para comercialização no Brasil, altamente resistente ao BGMV, devido à expressão de dsRNAs para silenciamento do gene *rep* (AC1) (BONFIM et al., 2007b; ARAGÃO; FARIA, 2009; ARAGÃO et al., 2013b; FARIA et al., 2016).

Em análises de comparação de regiões conservadas no gene *rep* de begomovírus, que ocorrem no Brasil ou com potencial de serem introduzidos, foram identificados quatro grupos filogenéticos com maior identidade de nucleotídeos. A expressão de pequenos RNAs (siRNAs) correspondendo a sequências de quatro begomovírus [tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV), tomato golden vein virus (TGVV), tomato severe rugose virus (ToSRV), tomato leaf distortion virus (ToLDV)], sendo um representante de cada cluster, possibilitaria a geração de resistência múltipla às espécies descritas infectando o tomateiro no Brasil, devido à piramidização de genes de resistência (DE PAULA, 2015; VIDAUSKI et al., 2008).

Desta forma, uma hipótese de trabalho foi que a expressão de pequenos RNA interferentes correspondendo ao fragmento do gene de uma v-ATPase de *B. tabaci* em plantas de tomateiro, pode silenciar o gene em moscas brancas interagindo com a planta, gerando linhagens tolerantes de tomateiro geneticamente modificadas (GM). Outra hipótese foi que tomateiros transformados para expressar pequenos RNA interferentes correspondente ao gene *rep* de quatro espécies de begomovírus, podem interferir na replicação do vírus pelo silenciamento do gene da proteína Rep, permitindo a obtenção de plantas com resistência/tolerância à begomovirose.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Análise da estratégia de silenciamento gênico via RNA de interferência como forma de controle de mosca-branca (*Bemisia tabaci*) e de begomovírus em tomateiro (*Solanum lycopersicum*).

#### 3.2 Objetivos específicos

- 3.2.1 Obtenção de diferentes linhagens de tomateiros da cultivar Micro-Tom, modificadas geneticamente para expressar siRNAs.
- 3.2.2 Análise do efeito da alimentação de moscas-brancas em plantas transgênicas de tomate expressando siRNA de *v-ATPase*.
- 3.2.3 Análise do efeito de siRNAs de *v-ATPase* no ciclo de vida da mosca-branca.
- 3.2.4 Análise da atratividade e preferência para oviposição em plantas expressando siRNAs de *v-ATPase*.
- 3.2.5 Análise populacional em casa de vegetação de moscas-brancas interagindo com plantas expressando siRNAs de *v-ATPase*.
- 3.2.6 Análise do efeito de siRNAs de *v-ATPase* sobre organismos não-alvo.
- 3.2.7 Análise da eficiência do hpRNA quimérico, com sequências do gene *rep* de quatro espécies de begomovírus associados ao tomateiro, no silenciamento da proteína Rep.

### 4 MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.1. Vetores

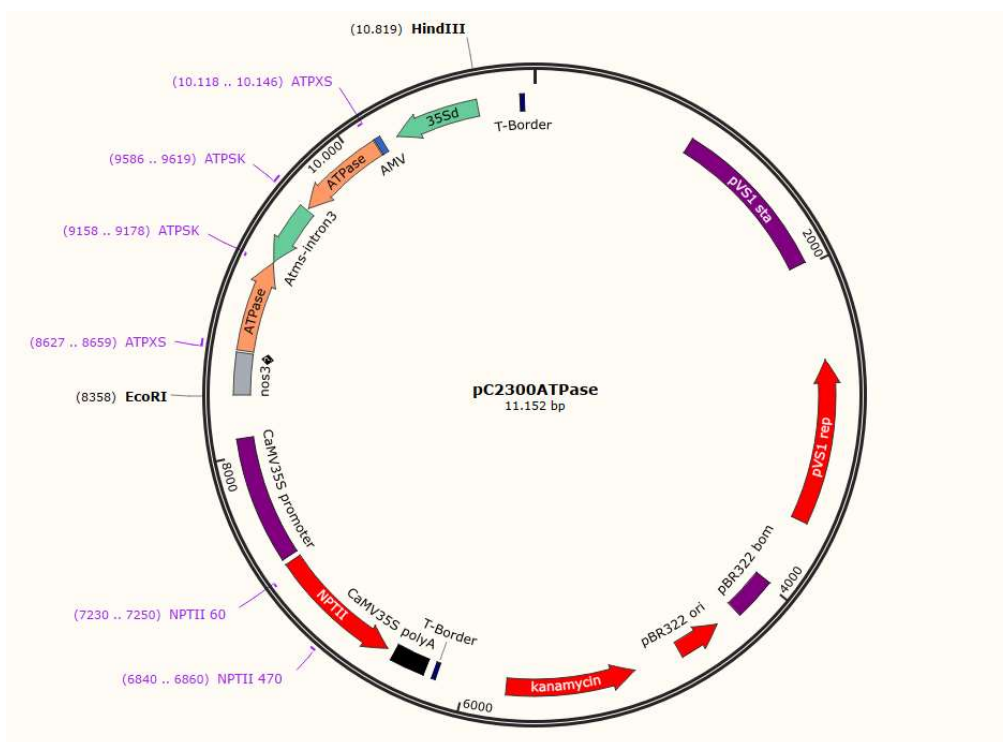
Os vetores desenvolvidos foram utilizados para transformar explantes cotiledonares de tomate da cultivar Micro-Tom via *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. Os cassetes de RNAi do tipo *intron-hairpin*, foram clonados no vetor pCAMBIA2300, contendo o gene *nptII*, que codifica para a enzima Neomicina Fosfotransferase tipo II (NPTII) e confere resistência à canamicina, utilizada para selecionar as células transformadas.

#### 4.1.1. pCAMBIA 2300ATPase

O plasmídeo pC2300ATPase contém o cassete de RNAi para silenciamento de uma sequência específica do gene *v-ATPase* de *B. tabaci*, que será denominado de *ΔATPase*.

O cassete de RNAi foi retirado do vetor pBtATPaseC3300 desenvolvido por Ibrahim et al. (2017), pela digestão com as enzimas de restrição Hind III e EcoRI. O fragmento obtido foi ligado nos sítios Hind III e EcoRI no vetor pCAMBIA2300, resultando no vetor pC2300ATPase (Figura 9).

O *ΔATPase* é composto de um fragmento de DNA de 545 pb do gene da subunidade A de *v-ATPase* de *B. tabaci* (IBRAHIM et al., 2017), clonado no sentido *sense* e *antisense* no vetor pSIU (TINOCO et al., 2010), separado pelo *intron 3* do gene *malate syntase* de *Arabidopsis thaliana* (Atms-i3), para assegurar a formação de hpRNAs. O cassete é conduzido pelo duplo promotor do 35S cauliflower mosaic virus (35SCaMV), seguido pela sequência *enhancer* do promotor, 5' UTR do vírus alfalfa mosaic virus (AMV) (DATLA et al., 1991), e o terminador do gene *nopalina synthase* (*nos3'*) de *A. tumefaciens*.



**Figura 9:** Representação esquemática do vetor pC2300ATPase, que contém as construções de RNAi para sequências específicas do gene *v-ATPase* de mosca-branca (*ΔATPase*), e o gene de seleção *nptII*, que confere resistência à canamicina.

#### 4.1.2. *pCAMBIA 2300-p4-gemini*

O plasmídeo pC2300-p4-gemini contém o cassete de RNAi quimérico para expressar dsRNAs correspondente às sequências do gene *rep* de quatro espécies virais de begomovírus que infectam tomateiro no Brasil, que será denominado de *Δp4Gemini*.

O *Δp4Gemini* foi retirado do vetor pC3300-fourgemini (DE PAULA, 2015), pela digestão com as enzimas de restrição Hind III e EcoRI. O fragmento obtido foi ligado nos sítios Hind III e EcoRI no vetor pCAMBIA2300, resultando no vetor pC2300-p4-gemini (Figura 10).

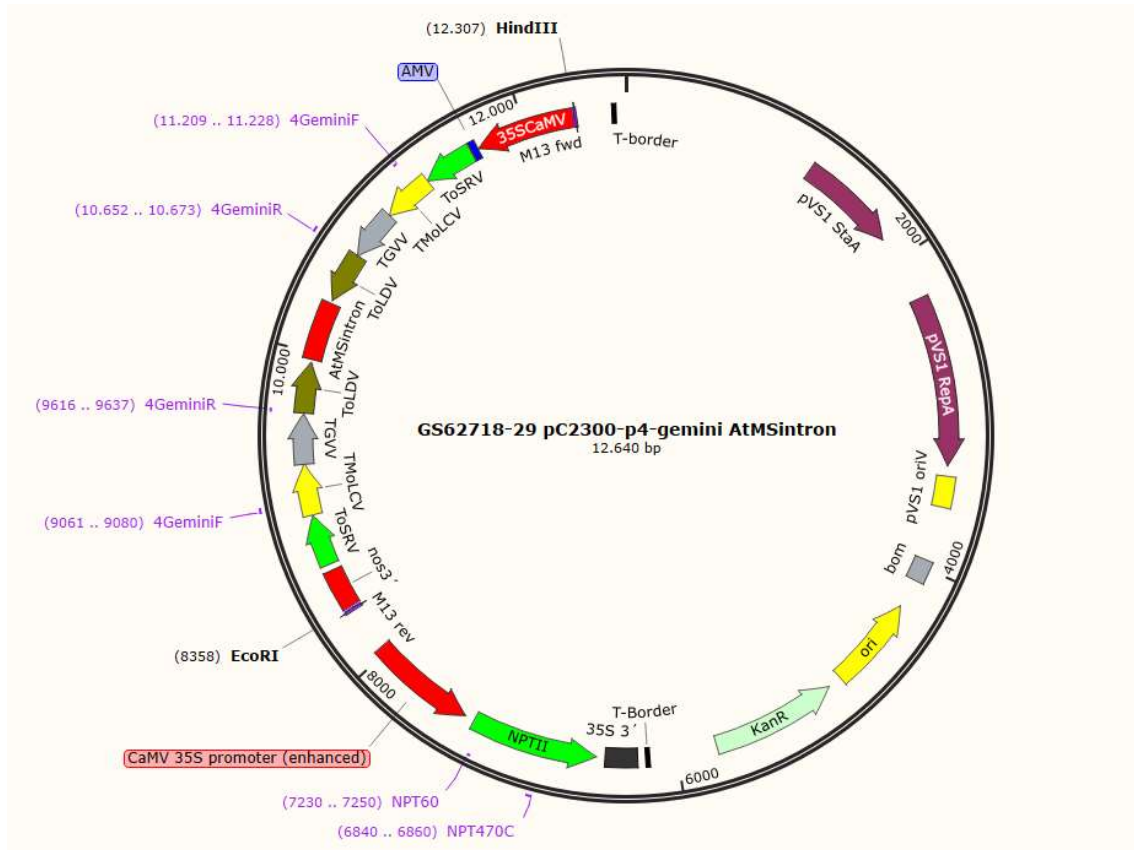
Para a construção do *Δp4Gemini*, inicialmente foi realizado um alinhamento com sequências nucleotídicas do gene *rep* de onze begomovírus associados ao tomateiro no Brasil, depositadas no GenBank (National Center for Biotechnology Information – NCBI): tomato rugose mosaic virus (ToRMV) AF291705.1; tomato severe rugose virus (ToSRV) DQ207749.1; tomato golden mosaic virus (TGMV) JF694490.1; tomato mild mosaic virus (ToMIMV) KC706611.1; tomato yellow spot virus (ToYSV) DQ336350.1; tomato leaf distortion virus (ToLDV) EU710749.1; tomato yellow vein streak virus (ToYVSV) EF417915.1; tomato golden vein virus (TGVV) JF803254.1; tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV) JF803246.1; tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV) AF490004.1; tomato interveinal chlorosis virus (ToICV) JF803252.1 (DE PAULA, 2015).

O alinhamento foi utilizado para elaboração de uma árvore filogenética, na qual foram verificados quatro clusters com maior identidade de nucleotídeos. Desta forma, as sequências virais de cada cluster foram alinhadas separadamente para análise das regiões conservadas. Quatro sequências conservadas do gene *rep* foram selecionadas para compor o cassete de RNAi, sendo escolhida uma sequência viral de cada cluster: tomato severe rugose virus – ToSRV (326 pb); tomato leaf distortion virus – ToLDV (320 pb); tomato golden vein virus – TGVV (319 pb); e tomato mottle leaf curl virus – TMoLCV (321 pb) (DE PAULA, 2015).

O fragmento de DNA quimérico (1.286 pb), formado pelas sequências selecionadas do gene *rep*, representando os quatro grupos virais, foi clonado no sentido



*sense e antisense no vetor pSIU (TINOCO et al., 2010), separado pelo intron 3 (Atms-i3), conduzido pelo duplo promotor 35SCaMV, seguido pela sequência do vírus AMV (DATLA et al., 1991) e terminador do gene nos3’.*



**Figura 10:** Representação esquemática do vetor pC2300-p4-gemini, que contém o cassete de RNAi *Δp4Gemini*, desenvolvido para silenciamento do gene *rep* específico para quatro diferentes espécies de begomovírus que infectam tomateiro no Brasil: ToSRV, ToMoLCV, TGVV e ToLDV, contendo também o gene de seleção *nptII*, sob o controle do duplo promotor constitutivo 35SCaMV, seguido pela sequência do AMV e terminador do gene *nos3’*.

#### 4.2 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA-105

*Agrobacterium tumefaciens* cepas EHA-105 desarmadas, que possuem gene de resistência à rifampicina, foram transformadas por eletroporação, para formação de duas linhagens de *A. tumefaciens* diferentes, contendo o DNA dos plasmídeos de interesses pC2300ATPase e o pC2300-p4-gemini (LACORTE; ROMANO, 1998). Amostras de 100  $\mu$ L de cada transformação foram plaqueadas em meio LB sólido, contendo canamicina

(100 mg/L) e rifampicina (100 mg/L) para seleção, e incubadas a 28 °C por dois dias. Clones obtidos foram multiplicados em meio LB líquido com os antibióticos seletivos por três dias a 28 °C e 180 rpm. Dos clones crescidos em meio LB líquido foram preparadas diferentes alíquotas de *A. tumefaciens* transformadas, com acréscimo de glicerol autoclavado. As alíquotas foram armazenadas em freezer -80 °C, com concentração final de 25% de glicerol.

#### 4.3 Transformação genética de tomateiro via *Agrobacterium tumefaciens*

A transformação genética vegetal foi realizada de acordo com Sun et al. (2006) com modificações. Sementes de tomate da cultivar Micro-Tom foram esterilizadas para germinação *in vitro*, para isso, sementes foram submersas em solução de etanol 70% (v/v) durante um minuto. Logo após, a solução de etanol 70% (v/v) foi retirada e as sementes foram submersas em uma solução de hipoclorito de sódio 2% (v/v) por cinco minutos, seguido de cinco enxágues com água destilada autoclavada, com auxílio de uma peneira de alumínio previamente autoclavada. As sementes foram secas em papel filtro autoclavado e transferidas para frascos contendo 30 mL de meio de germinação, composto por ½ MS com vitaminas, 1,5% de sacarose (m/v) e 0,7% ágar (m/v), com pH ajustado para 5,7. A germinação foi conduzida por um período de oito a dez dias em câmara de cultura a 25 ± 2 °C. Inicialmente os frascos foram mantidos no escuro por volta de seis dias e após foram transferidos para luz sob fotoperíodo de 16 horas.

Para a transformação genética, alíquotas de *A. tumefaciens* contendo os plasmídeos desejados (pC2300ATPase e pC2300-p4-gemini) foram plaqueadas em meio AB sólido (CHILTON et al., 1974), contendo os antibióticos rifampicina (100 mg/L) e canamicina (100 mg/L), e incubadas por dois a três dias, a 28 °C. Em seguida, parte da cultura bacteriana crescida no meio AB sólido foi coletada com auxílio de uma espátula e ressuspenida em um tubo de 50 mL do tipo Falcon contendo meio de cocultura líquido, composto por sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com sacarose 3% (m/v), PVP 200 mg/L, MES 200 mg/L, BAP 5 µM, AIA 0,1 µM, acetoseringona 200 µM, cisteína 400 mg/L e vitamina B5, com pH ajustado para 5,2. A suspensão bacteriana foi homogeneizada, em agitador tipo Vortex™, e diluída até a obtenção de uma OD600 = 0,5, mensurada em espectrofotômetro (BioPhotometerplus - Eppendorf). Os cotilédones provenientes de plântulas de ‘Micro-Tom’ germinadas *in vitro*, por oito a dez dias, foram retirados e colocados em uma placa Petri contendo a suspensão bacteriana. Com auxílio

de pinça e bisturi estéreis, os cotilédones foram cortados ao meio, de forma transversal, e nas extremidades distais e proximais das folhas, em contato com a agrobactéria. Explantes cotiledonares obtidos ficaram imersos na suspensão bacteriana por 30 minutos. Em seguida, os explantes foram secos, em papel filtro autoclavado, e inoculados, com a superfície abaxial voltada para baixo, em meio de cocultura sólido, durante 48 horas no escuro a  $25 \pm 2$  °C. Para meio de cocultura sólido, foi utilizada a mesma composição do meio de cocultura líquido com adição de 0,6% de ágar (m/v).

Após dois dias em cocultura sólida, os explantes foram transferidos para meio de indução contendo canamicina como agente seletivo para regeneração de explantes transformados. O meio de indução foi composto por sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com sacarose 2% (m/v), PVP 200 mg/L, MES 200 mg/L, nitrato de prata 2 mg/L, zeatina 5 µM, AIA 0,1 µM, vitamina B5, Timentin® 100 mg/L, cefotaxima 200 mg/L e ágar 0,6% (m/v), pH 5,7.

A concentração inicial de seleção, de explantes transformados com o plasmídeo pC2300ATPase ou pC2300-p4-gemini, foi de 50 mg/L de canamicina, com redução para 25 mg/L, após três a quatro semanas.

Os explantes foram inoculados com a superfície abaxial em contato com o meio e as placas foram vedadas com micropore. A cada 15 dias, os explantes foram transferidos para novo meio de indução com seleção e as gemas resistentes, foram repicadas, até a diferenciação dos tecidos.

Brotos emergentes foram transferidos para meio de alongamento composto por sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com sacarose 3% (m/v), vitamina B5, Timentin® 100 mg/L, cefotaxima 200 mg/L, canamicina 25 mg/L e ágar 0,6% (m/v), pH 5,7.

Brotos bem desenvolvidos foram transferidos para um meio de enraizamento composto de sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com sacarose 3% (m/v), IBA ou AIA 1 mg/L, vitamina B5, Timentin® 100 mg/L, cefotaxima 200 mg/L e ágar 0,6% (m/v), com pH ajustado para 5,7. Alguns brotos enraizaram em meio de alongamento, não necessitando a transferência para o meio de enraizamento. Em alguns casos, o agente seletivo foi retirado na etapa de alongamento/ enraizamento de brotos resistentes para favorecer o desenvolvimento e reduzir o tempo para obtenção de plantas enraizadas.

Com o desenvolvimento pleno das raízes, as plantas foram aclimatadas em casa de vegetação, em uma mistura de solo, substrato e vermiculita, na proporção de 1:1:1. Inicialmente as plantas foram cobertas com um saco plástico, e após uma semana o saco foi retirado.

As plantas aclimatadas foram transferidas para vasos maiores e permaneceram em casa de vegetação para produção de frutos. Os frutos maduros foram colhidos e as sementes foram coletadas, identificadas e armazenadas a 4 °C.

#### *4.4 Análises das plantas transformadas*

##### *4.4.1 Extração de DNA e PCR*

O DNA das plantas regeneradas a partir de explantes cotiledonares foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987), com modificações. O material vegetal coletado foi macerado em tubos de centrifuga, tipo Eppendorf, na presença do tampão CTAB 2% (m/v) (brometo de cetrimônio) e incubados a 65 °C por 20 minutos. Para desnaturação e solubilização das proteínas foi adicionado clorofórmio-álcool isoamílico 24:1, e os tubos contendo a mistura foram homogeneizados em agitador do tipo Vortex<sup>TM</sup> e centrifugados a 14.000 rpm por cinco minutos. A fase aquosa formada na parte superior, que contém o DNA, foi coletada e transferida para um novo tubo, devidamente identificado. O DNA foi precipitado em isopropanol gelado, sendo homogeneizado e mantido por 10 minutos a temperatura ambiente, e logo após, centrifugado por cinco minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com adição de etanol 70% (v/v), que foi novamente centrifugado a 14.000 rpm por cinco minutos. Por fim, o sobrenadante foi descartado e após secagem o sedimento foi ressuspenso em água milli-Q autoclavada.

O DNA extraído foi submetido a uma reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se a enzima Taq DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen), conforme recomendado pelo fabricante. Para detecção do gene *nptII* (411 pb) utilizou-se o par de primers NPTII 60 e NPTII 470. Para detecção de 545 pb do gene  $\Delta$ *ATPase*, utilizou-se o par de primers ATPXS e ATPSK. Para detecção do cassete de RNAi químico *Ap4Gemini* utilizou-se o par de primers 4GeminiF e 4GeminiR, para detecção de um fragmento de 577 pb (Tabela 2).

**Tabela 2:** Primers utilizados para detecção de sequências de DNA.

Primer	Sequência	Uso
NPTII 60	5' GAGGCTATTCGGCTATGACTG 3'	Detecção do gene <i>nptII</i> (411pb)
NPTII 470	5' TCGACAAGACCGGCTTCCATC 3'	
ATPXS	5' CTGACTTCTAGAGCTCGCATCCGAAAGCGCCGGGAATG 3'	Detecção do gene <i>ΔATPase</i> (545 bp)
ATPSK	5' ACGTACGGGTACCACTAGTCGGCGACCCTGTACAGCGAAC 3'	
4GeminiF	5' AGCTGATCTGCCGTCGATTT 3'	Detecção do gene <i>Δp4Gemini</i> (577 bp)
4GeminiR	5' TCCGACGTCAAGTCCTAGTAAA 3'	

Em um termociclador, a reação de PCR foi submetida à 95 °C, por cinco minutos para desnaturação, e amplificada por 35 ciclos (95 °C por um minuto, 55 °C por um minuto, 72 °C por dois minutos) com um ciclo final à 72 °C por sete minutos.

Os produtos da PCR foram visualizados em transiluminador (Bio Rad Laboratories) após eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), corrido em tampão TBE (Tris – borato - EDTA) 0,5X e corados com SYBR safe.

#### 4.4.2 Ensaio de fluxo lateral

Plantas transgênicas, confirmadas por PCR, foram testadas pelo método de imunoenensaio de fluxo lateral (*ImmunoStrip* - Agdia, EUA) para detecção da proteína NPTII (Neomicina Fosfotransferase tipo II). Amostras foliares foram maceradas na presença do tampão comercial fosfato-salino (PBS) 1X, conforme as instruções do fabricante. Após obter o macerado, tiras foram inseridas para detectar a expressão de proteína.

#### 4.4.3 Análise das progênies

Das plantas transgênicas obtidas (geração T<sub>0</sub>), foram recolhidas as sementes de autofecundação, considerando que há baixa taxa de polinização cruzada. As sementes foram germinadas em uma mistura de terra: substrato: vermiculita, na proporção de 1:1:1, e as plantas germinadas foram analisadas por PCR para detecção dos transgenes. Para determinar se a taxa de segregação observada foi consistente com uma razão mendeliana (3:1), ao nível de confiança de 95%, foi usado o teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) de Pearson, com utilização do fator de correção de Yates, para os casos em que uma das frequências fosse menor que 5, ou quando o valor total de plantas avaliadas fosse menor que 20.

#### 4.4.4 Análises de siRNAs

O RNA total do tomateiro, de plantas não-transgênicas e de oito linhagens transgênicas em homozigose, obtidas da transformação de explantes cotiledonares com o vetor pC2300ATPase, foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), conforme as recomendações do fabricante. A análise de siRNA foi realizada conforme descrito por Bonfim et al. (2007b). O RNA total foi separado por gel de acrilamida 20% (v/v), contendo 7M de uréia e TBE 1X. Após o gel foi corado com brometo de etídeo e fotografado. O RNA foi transferido do gel de acrilamida para uma membrana Hybond – N + (Amersham Pharmacia Biotech) e fixados na membrana por exposição a uma dose padrão de luz UV.

A hibridação foi realizada usando uma sonda de DNA correspondente ao fragmento de PCR *v-ATPase*, amplificado pelo par de primers ATPXS/ATPSK (Tabela 2), marcado com  $\alpha^{32}\text{P}$  dCTP, utilizando o kit DecaLabel (Thermo Fisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. As lavagens de hibridação e pós-hibridação foram realizadas conforme descrito por Yoo et al. (2004). Oligômeros (18, 25 e 39 nucleotídeos) foram utilizados como marcadores de tamanho molecular. As bandas foram visualizadas com um analisador de imagem fluorescente (FLA-3000; FUJIFILM).

#### 4.5 Ensaios com mosca-branca realizados em tomateiros transformados para expressar siRNAs de $\Delta$ ATPase

Os ensaios com plantas de tomate transgênicas, obtidas da transformação de explantes cotiledonares com o vetor pC2300ATPase, e com plantas de tomate não-transgênicas, utilizadas como controle, foram realizados na Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás/GO e na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília/DF.

##### 4.5.1 Cultura de moscas-brancas

Para os ensaios, foram utilizadas moscas-brancas provenientes de uma colônia de *B. tabaci* MEAM1 (=biótipo B), mantida em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em uma casa de vegetação na Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás/GO, Brasil. Para evitar depressão consanguínea, foram introduzidas novas espécies regularmente na colônia, que tem sido monitorada por meio do sequenciamento do gene *mitochondrial citocromo oxidase I* (mtCOI).

#### 4.5.2 Análise de mortalidade das moscas-brancas

Análises de mortalidade das moscas-brancas foram realizadas em três linhagens de tomateiro transgênicos (4.4.1, 6.8.4 e 9.2), obtidas da transformação de explantes cotiledonares com o vetor pC2300ATPase, e em plantas não-transgênicas, representando o controle do ensaio. Após quatro semanas do plantio, três plantas de cada tratamento foram submetidas à oviposição por um período de duas horas. Depois disso, as moscas-brancas adultas foram removidas e as plantas foram isoladas em gaiolas individuais (68 cm x 27 cm x 27 cm), mantidas em casa de vegetação (Figura 11). Os insetos desenvolveram-se dos ovos para adultos, e a mortalidade adulta foi registrada após cinco a sete dias. Para facilitar a visualização de insetos mortos dentro da gaiola, as plantas foram colocadas sobre uma lona plástica preta (Figura 11). No sétimo dia, o número total de insetos vivos e mortos foi contado, com auxílio de um aspirador para remoção dos insetos. Em seguida, também foi registrado o número de pupas vazias nas folhas, visualizadas sob um estereomicroscópio. Para calcular o percentual de mortalidade, foi considerado o número de pupas vazias como o número total de insetos adultos em cada repetição. Este ensaio foi repetido duas vezes e os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA). O teste de Levene foi aplicado para verificar a homogeneidade da variância e a média dos percentuais de mortalidade foram analisados pelo teste Dunnett a 5%, utilizando o software GraphPad Prism versão 6.0.



**Figura 11:** Sistema de monitoramento para análise de mortalidade das moscas-brancas em tomateiros transformados para expressar siRNAs de  $\Delta ATPase$ .

#### 4.5.3 Análise de desenvolvimento das moscas-brancas

Para análise do efeito de siRNAs de  $\Delta ATPase$  no ciclo de vida da mosca-branca, o desenvolvimento do estágio de ovo ao adulto foi avaliado em plantas da linhagem transgênica 4.4.1 em homozigose e em plantas não-transgênicas (controle). Foram avaliados 10 ovos individuais por planta, com cinco a oito repetições por tratamento. Para isso, plantas de quatro semanas foram expostas à oviposição de mosca-branca por 1 hora, com retirada dos adultos após esse período. Assim que as ninfas de 1º ínstar tornaram se sésseis, foram circuladas e numeradas usando um marcador permanente, de forma cuidadosa para não danificar a planta ou o inseto. As plantas foram mantidas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , com 70% a 80% de umidade relativa, e 16 horas de fotoperíodo. A fase ninfática de cada indivíduo foi analisada diariamente, com auxílio de um estereomicroscópio, até a emergência dos adultos. A mortalidade em cada estágio também foi registrada. Para cada estágio da ninfa, a mortalidade das ninfas *B. tabaci* desenvolvidas na linhagem transgênica do tomate foi comparada ao controle usando o teste de qui-quadrado ( $p < 0,05$ ). O teste de normalidade Shapiro-Wilk foi conduzido para testar a normalidade dos dados e quando os dados não estavam em uma distribuição normal, um teste não paramétrico de Wilcoxon com correção de continuidade foi aplicado para comparações médias.

#### 4.5.4 Análise de atratividade e preferência para oviposição

Foi realizado um experimento de livre escolha para avaliar a atração e preferência das moscas-brancas adultas em plantas transgênicas e não-transgênicas de tomate. Para isso, após quatro semanas do plantio, dez plantas germinadas da linhagem 4.4.1, em homozigose, e dez plantas não-transgênicas, foram dispostas de maneira intercalada em um círculo, dentro de uma casa de vegetação sem moscas-brancas. Em seguida, 300 insetos adultos foram liberados no centro do círculo (Figura 12). Após 48 horas, o número de adultos em cada planta foi contado, olhando cuidadosamente as folhas. Após cinco dias, o número de ovos por planta foi contado, com auxílio de um estereomicroscópio.





**Figura 12:** Experimento de livre escolha realizado em casa de vegetação para avaliar a atratividade e preferência para oviposição das moscas-brancas adultas em tomateiros não-transgênicos e transgênicos, expressando siRNAs de  $\Delta ATPase$ .

#### 4.5.5 Ensaio em casa de vegetação

Para análise do efeito na população e no ciclo de vida de moscas-brancas alimentadas por plantas transgênicas, expressando siRNAs de  $\Delta ATPase$ , um delineamento experimental de blocos casualizados foi montado em uma casa de vegetação. Os tratamentos foram compostos pelas plantas transgênicas da linhagem 4.4.1, em homozigose, e plantas não-transgênicas (controle).

Após postura, uma planta de feijão, contendo diversos ovos de mosca-branca, foi disposta no centro de cada bloco (bancada). Após 30 dias da postura, foi realizada a 1ª amostragem de moscas nos tratamentos. Para amostragem foi contabilizado o número de moscas-brancas em 12 plantas, escolhidas aleatoriamente, de cada tratamento por bloco. As amostragens foram realizadas semanalmente até a oitava semana, sendo que, na última semana foram contabilizadas apenas seis plantas por bloco.

Os valores médios foram submetidos à Análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5%, utilizando o software GENES (CRUZ, 2013) e o gráfico foi elaborado no software GraphPad Prism versão 6.0.

#### 4.5.6 RT-PCR quantitativa (RT- qPCR)

O nível de transcrição do gene endógeno *v-ATPase* em *B. tabaci* interagindo com plantas transgênicas oriundas da linhagem 4.4.1 (homozigotas) e não-transgênicas foi determinado por transcrição reversa seguida de PCR quantitativa (RT-qPCR). O isolamento RNA e RT-qPCR foram realizados conforme descrito por Andrade et al. (2016). As moscas-brancas adultas foram liberadas em plantas de tomateiros transgênicos e não-transgênicos, isolados em gaiolas individuais, conforme descrito acima para os ensaios de mortalidade por mosca-branca. Após 48 horas, o RNA total foi extraído de 150 insetos sobreviventes, por repetição, dos quais 200 ng de cada uma das amostras foram usados para sintetizar cDNA usando o kit GoScript Reverse Transcription System (Promega), conforme recomendação do fabricante. As reações foram realizadas usando o StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) com SYBR-Green. Os primers para os genes endógenos *v-ATPase* (GGTGGAGACTTGTACGGTATTG e TGACAGTACCTTTGGCTTTAGG) e actina (GACCAGCCAAGTCCAAACGA e CCTTTGTGGTAGAGGTCTCAGTT) foram projetados usando a ferramenta PrimerQuest (IDT Integrated DNA Technologies, Inc.). Os níveis relativos de transcrição de *v-ATPase* em diferentes amostras de RNA foram normalizados em relação ao gene actina (Acesso OU963862.1), utilizado como controle interno. Os ensaios quantitativos foram realizados a partir de três amostras biológicas. O nível relativo da expressão foi calculado usando o método Livak (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

#### 4.6 Análises em organismos não-alvo

Devido às semelhanças nas sequências do gene *v-ATPase* entre insetos, foram realizados ensaios para avaliar efeitos negativos em insetos não-alvo interagindo com tomateiros transgênicos da linhagem 4.4.1 em homozigose, que produzem siRNAs de *ΔATPase*. Desta forma, foram realizadas análises *in silico*, e ensaios de alimentação com o pulgão *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphidae), e com lagartas de *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae).

##### 4.6.1 Análise *in silico* de sequências do gene *v-ATPase*

Para análise de similaridade entre as sequências nucleotídicas do gene *v-ATPase*, sequências de *v-ATPase* de *B. tabaci* foram comparadas com sequências de *Myzus*

*persicae* e *Tuta absoluta*, utilizando a ferramenta BLASTn e o software si-Fi (LÜCK et al., 2019).

#### 4.6.2 Ensaio com *Myzus persicae*

Os pulgões *M. persicae* foram coletados de colônias naturais em plantas daninhas, e mantidos em plantas de tomateiro até serem utilizados no experimento.

Ninfas de *M. persicae* de quarto ínstar foram gentilmente transferidas para as plantas de tomate, sendo ao todo, transferidos 50 insetos por planta, com seis repetições de cada tratamento (tomateiros transgênicos, da linhagem 4.4.1 em homozigose, e não-transgênicos). As plantas foram mantidas a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , com 70% - 90% de umidade relativa, sob condições de casa de vegetação, sem iluminação adicional. Após sete dias de alimentação o número total de pulgões foi contabilizado com auxílio de um microscópio estereoscópio.

#### 4.6.3 Ensaio com *Tuta absoluta*

As colônias de *T. absoluta* foram obtidas de plantas de tomateiro cultivadas sob condições de estufa na Embrapa Hortaliças (Brasília, DF). A criação foi mantida no laboratório em gaiolas, contendo plantas de tomateiro da cultivar Santa Clara Baby.

##### 4.6.3.1 Ensaio com *T. absoluta* em folhas destacadas de tomateiro

Folhas provenientes de plantas de tomate transgênicas (linhagem 4.4.1 em homozigose) e não-transgênicas foram destacadas e dispostas individualmente em placas Petri. Para manter a turgências das folhas, o pecíolo foi envolto por um algodão embebido com água, que era umedecido diariamente, de acordo com a necessidade. Foram transferidas três lagartas de *T. absoluta* por folha, sendo realizadas duplicatas para cada estágio da lagarta (ínstar L1 a L3). As folhas foram fotografadas diariamente para acompanhar a extensão dos danos nos tecidos foliares, devido à alimentação das lagartas. As fotos foram avaliadas pelo software ImageJ ([imagej.nih.gov/ij/](http://imagej.nih.gov/ij/)) para determinar o percentual de dano foliar. Após 27 dias, o número de adultos emergentes foi registrado e expresso pelo percentual de adultos normais em relação ao número total de lagartas.

#### 4.6.3.2 Ensaio com *T. absoluta* em plantas de tomate

Seis plantas de tomate transgênicas (oriundas da linhagem 4.4.1 em homozigose) e seis não-transgênicas foram dispostas aleatoriamente em uma gaiola (45 cm x 45 cm x 55 cm), na qual foram adicionadas uma média de seis traças de *T. absoluta* por planta. Um algodão embebido em uma solução com 10% de mel (v/v) foi colocado na parte superior da gaiola para prolongar a vida dos adultos da traça do tomateiro. Após 22 dias, os adultos restantes foram eliminados e as plantas foram distribuídas em novas gaiolas. Foram colocadas duas plantas do mesmo tratamento por gaiola, totalizando três repetições de cada. O número de adultos emergidos foi contabilizado por quatro semanas.

#### 4.7 Desafio com tomateiros transgênicos transformados para expressar siRNAs de $\Delta p4$ Gemini

Tomateiros transgênicos (Geração T<sub>1</sub>), obtidos da transformação de explantes cotiledonares com o vetor pCAMBIA2300-p4-gemini, contendo o cassete de RNAi quimérico para silenciamento do gene *rep* de quatro begomovírus (ToSRV, TMoLCV, TGVV e ToLDV), foram desafiadas para análise de resistência ao tomate mottle leaf curl virus (TMoLCV).

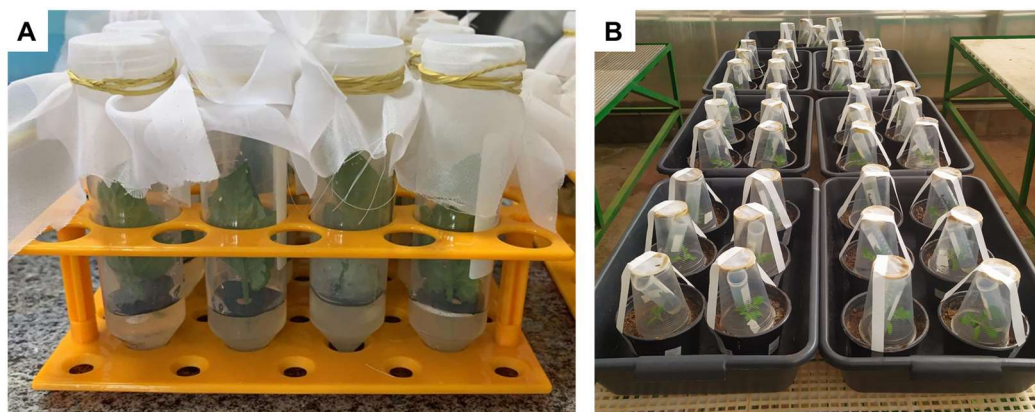
Tomateiros transgênicos e não-transgênicos (controle) utilizados no desafio, foram inoculados através do vetor biológico, a mosca-branca. Foram utilizadas moscas-brancas adultas provenientes de uma colônia de *B. tabaci* MEAM1 (=biótipo B), mantida em couve (*Brassica oleracea* L.) em uma casa de vegetação na Embrapa Hortaliças, Fazenda Tamanduá, Rodovia BR-060, Km 09 (Brasília/Anápolis), Brasil.

Como fonte de inóculo do vírus, plantas de tomate da cultivar susceptível Viradouro (GIORDANO et al., 2000b) foram agro-inoculadas com *A. tumefaciens* transformadas para conter o clone infeccioso do vírus TMoLCV. As plantas agro-inoculadas foram monitoradas quanto ao aparecimento dos sintomas e avaliadas via PCR para confirmação da infecção.

Folhas apresentando sintomas, foram destacadas e dispostas em tubos de polietileno de 50 mL, contendo de cinco a dez mL de meio ágar para manutenção da turgência das folhas. Discos pretos de EVA, com furo no centro, foram colocados em cima do meio ágar, para evitar contato com as moscas. Para aquisição do vírus, foram incluídas 80 moscas-brancas avirulíferas por tubo, contendo uma folha de tomateiro infectado com o vírus TMoLCV. A parte superior dos tubos foram cobertas com tecido

voil, preso com auxílio de um elástico (Figura 13A), para permitir a circulação do ar. As moscas permaneceram nesse sistema por um período de dois dias (48 horas) para garantir a aquisição do vírus (PAA).

Mudas de tomate (transgênicas e não-transgênicas) apresentando, no mínimo, duas folhas verdadeiras, foram inoculadas com a introdução de aproximadamente 80 moscas-brancas virulíferas em um sistema de confinamento. Para o confinamento das moscas nas plantas foram utilizados copos plásticos, com a parte inferior telada e com a parte superior voltada para baixo (Figura 13B). Após sete dias, as plantas foram transferidas para casa de vegetação e os copinhos foram removidos. Para eliminação das moscas, foi utilizado um inseticida spray à base de água.



**Figura 13:** (A) Sistema para aquisição do vírus (PAA) pelo inseto-vetor, a mosca-branca; (B) Sistema de confinamento de moscas-brancas virulíferas para inóculo.

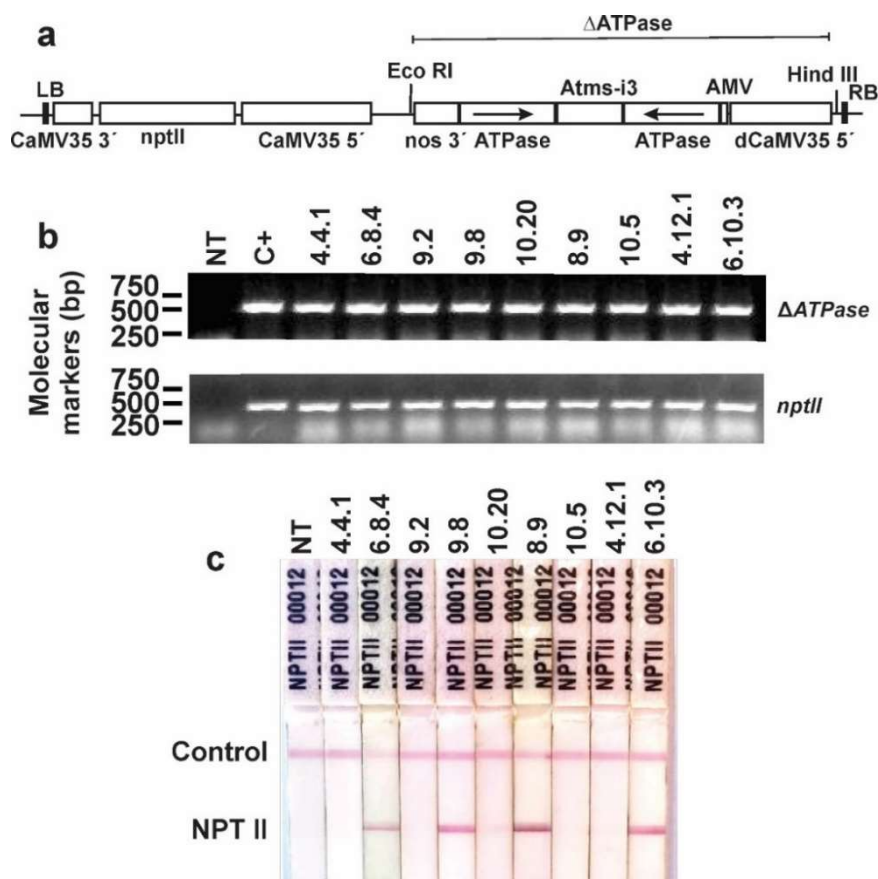
As plantas foram observadas semanalmente para acompanhamento do aparecimento dos sintomas. Após 30 dias da inoculação (30 dpi), o DNA das plantas foi extraído para análise individual por PCR, utilizando primers universais de begomovírus, PAL1V1978 e PAR1c715, para detecção viral do TMoLCV (ROJAS et al., 1993). Também foram utilizados *ImmunoStrips* para detecção de begomovírus, conforme recomendação do fabricante (Agdia, USA).

As plantas que apresentaram um fenótipo de resistência foram selecionadas e mantidas em casa de vegetação para obtenção de frutos, visando avançar a geração, analisar as progênes e obter populações homozigotas para os transgenes.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

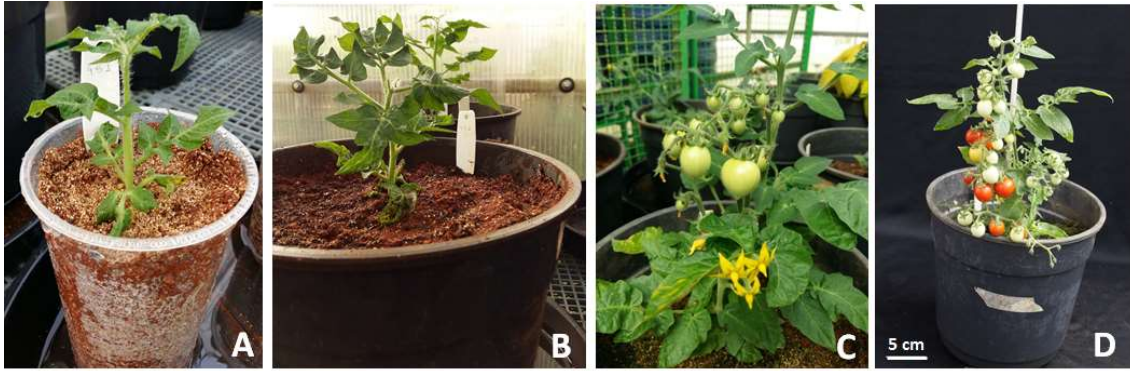
### 5.1 *Linhagens transgênicas obtidas da transformação via Agrobacterium com o vetor pC2300ATPase*

Foram obtidas nove linhagens transgênicas primárias (T<sub>0</sub>) independentes, a partir da transformação de explantes cotiledonares com o vetor pC2300ATPase, contendo o cassete de RNA interferente ( $\Delta$ ATPase) (Figura 14A). As análises por PCR revelaram a presença de ambos transgenes  $\Delta$ ATPase (545 pb) e *nptII* (411 pb) em todas as linhagens transgênicas (T<sub>0</sub>) (Figura 14B). Progênie PCR-positivas foram analisadas quanto à expressão da proteína neomicina fosfotransferase II (NPT II) usando o método imunoensaio de fluxo lateral. Plantas expressando a proteína NPTII apresentaram duas bandas, no qual a banda superior representa a linha controle, necessária para validação do teste, e a banda inferior representa a presença da proteína. Uma banda forte foi observada nas linhagens 6.8.4, 6.10.3, 8.9 e 9.8, e uma banda fraca nas linhagens 10.20 e 4.12.1. No entanto, as linhagens 4.4, 9.2 e 10.5 não apresentaram a banda inferior referente à detecção de expressão da proteína NPT II, assim como nas plantas não-transgênicas (controle) (Figura 14C).



**Figura 14:** Análises moleculares das linhagens transgênicas, obtidas da transformação com o vetor pC2300ATPase. (A) Representação esquemática da região T-DNA do vetor pC2300ATPase, contendo a construção de RNAi para sequências específicas do gene  $\nu$ -ATPase da mosca-branca ( $\Delta$ ATPase), e o gene *nptII*, que codifica para a enzima NPTII (neomicina fosfotransferase II) e confere resistência à canamicina. (B) Análise de PCR de nove linhagens transgênicas para detecção dos transgenes  $\Delta$ ATPase e *nptII*. O controle positivo (C+) corresponde a reação de PCR feita com o vetor pC2300ATPase. (C) Teste *ImmunoStrip* de plantas PCR-positivas para detecção de neomicina fosfotransferase II (NPTII). NT são plantas não-transgênicas.

As plantas transformadas (T<sub>0</sub>) foram aclimatadas e cultivadas em casa de vegetação para obtenção de frutos (Figura 15). A linhagem 6.10.3 apresentou vários frutos sem sementes e um número significativamente menor de sementes por fruto (média de 1,3 sementes/fruto) quando comparada às outras linhagens transgênicas e plantas não-transgênicas (média de 27,9 sementes/fruto). Desta forma, a linhagem 6.10.3 não foi utilizada para estudos adicionais, porém, futuramente, poderá ser investigada quanto a possível mutação devido à inserção do transgene.



**Figura 15:** Plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum L.*), provenientes de explantes cotiledonares transformados com o vetor pC2300ATPase, aclimatadas em casa de vegetação. (A e B) Plantas aclimatadas, mantidas em casa de vegetação para produção de frutos; (C e D) Plantas transformadas florescendo e produzindo frutos.

### 5.1.1 Análise das progênies

Com base nas análises de PCR e no teste de Qui-quadrado, verificou que os transgenes  $\Delta ATPase$  e *nptII* co-segregaram na geração T<sub>1</sub> (autopolinização), ajustando-se estreitamente à proporção mendeliana de 3:1, como esperado para um locus de integração (Tabela 3).

**Tabela 3:** Análise de segregação da Geração T<sub>1</sub>, proveniente de autopolinização, de plantas transgênicas, obtidas da transformação com o vetor pC2300ATPase.

Lines	Positive <sup>a</sup>	Negative	$\chi^2$	P <sup>b</sup>
4.4.1	15	5	0.00	1
6.8.4	16	4	0.47	0.61
9.2	7	2	0.26	0.85
9.8	7	5	1.44	0.18
10.20	14	8	1.52	0.22
8.9	23	11	0.98	0.32
10.5	7	5	1.44	0.18
4.12.1	15	4	0.34	0.69
6.10.3	12	2	1.23	0.35

(a) Dados baseados em análises de PCR para detecção dos transgenes de  $\Delta ATPase$  e *nptII*.

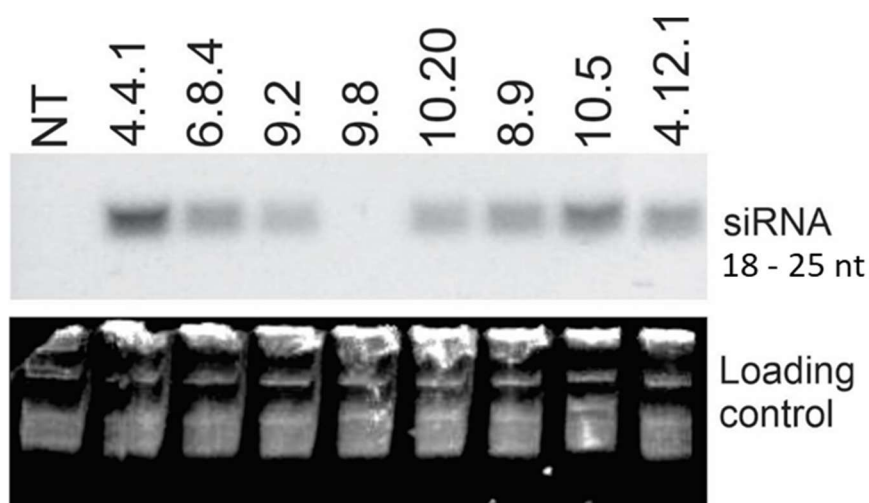
(b) P é a probabilidade que os valores observados reflitam a taxa de segregação 3:1 ( $\alpha = 0,05$ ).



### 5.1.2 – Análise de siRNAs

Análises de *Northern blot* foram realizadas para detectar siRNAs de  $\Delta ATPase$  em folhas de tomateiros transgênicos e em tomateiros não-transgênicos. Os resultados revelaram a presença de bandas de siRNA, conforme o tamanho esperado, entre 18 e 25 nt, para as linhagens transgênicas 4.4.1, 6.8.4, 9.2, 10.20, 8.9, 10.5 e 4.12.1. Nenhum sinal foi observado em plantas não-transgênicas e na linhagem 9.8 (Figura 16).

Não foi observada correlação qualitativa entre a expressão do gene *nptII* (Figura 14C) e a expressão do transgene  $\Delta ATPase$  (quantidade de siRNAs) (Figura 16). Resultado similar foi observado por Aragão et al. (2013), no qual não observaram correlação entre a quantidade de siRNAs produzidos por plantas de feijão transgênicas, geneticamente transformadas para expressar dsRNAs do gene *rep* (AC1) do bean golden mosaic vírus (BGMV), e a expressão do gene *ahas*, usado para a seleção de plantas transformadas.

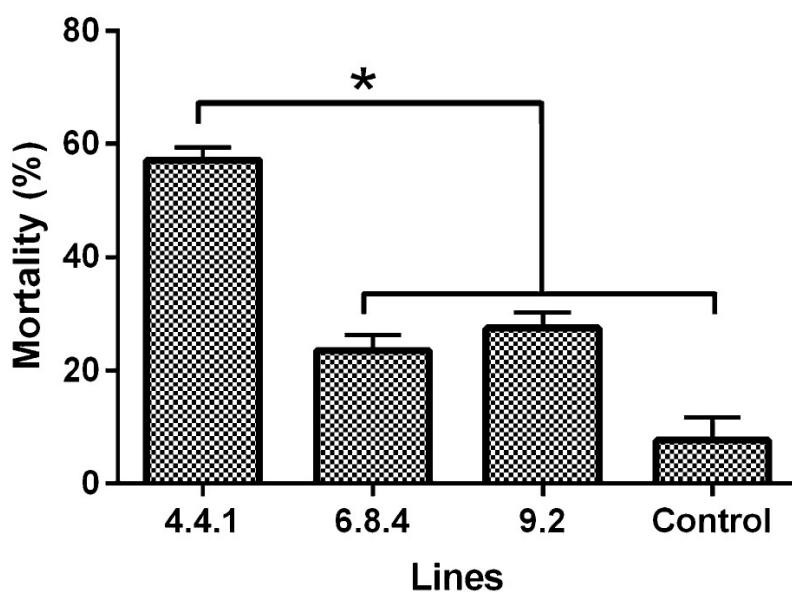


**Figura 16:** Análise de *Northern blot* para detecção de siRNAs (18 – 25 nt) de  $\Delta ATPase$  isolado das linhagens de tomate transgênicas. O gel foi corado com SYBR para controle da corrida e controle de carga do RNA isolado. NT: planta não-transgênica.

A linhagem 4.4.1 apresentou sinal forte na análise de *Northern blot*, indicando maiores quantidades de siRNAs, e por isso foi escolhida para os experimentos de alimentação de mosca-branca e ensaios de mortalidade. As linhagens 6.8.4 e 9.2, que apresentaram sinal intermediário e fraco, respectivamente, também foram escolhidas na tentativa de estabelecer a relação causa-efeito entre a tolerância aos insetos e às quantidades de siRNAs produzidas pelo hospedeiro.

### 5.1.3 – Análise de mortalidade de moscas-brancas

Progênes das linhagens 4.4.1, 6.8.4 e 9.2, que apresentaram na análise de *Northern blot* um sinal forte, intermediário e fraco, respectivamente (Figura 16), foram desafiadas com moscas-brancas adultas recém surgidas e sua mortalidade foi registrada após cinco a sete dias. Moscas-brancas interagindo com as plantas da linhagem transgênica 4.4.1 apresentaram taxa de mortalidade mais alta (57,1%), diferença estatisticamente significativa quando comparadas aos insetos interagindo com as plantas das linhagens 6.8.4 (23,5% de mortalidade) e 9.2 (27,5% de mortalidade), e com plantas não-transgênicas, utilizadas como controle (7,6% de mortalidade) ( $P < 0,05$ ) (Figura 17). Tais resultados apontam para uma correlação entre a quantidade de siRNAs produzidos pela planta e a resposta de resistência/tolerância à mosca-branca, assim como observado por Ferreira et al. (2022), no qual apenas a linhagem de feijoeiro expressando maior quantidade de siRNAs de *v-ATPase*, apresentou uma mortalidade significativa para insetos adultos de mosca-branca.



**Figura 17:** Mortalidade de *B. tabaci* alimentado em tomateiros transgênicos das linhagens 4.4.1, 6.8.4 e 9.2, e em tomateiros não-transgênicos (Controle), por um período de sete dias (\* $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ).

Em outros trabalhos, também foram verificados um aumento considerável nas taxas de mortalidade de moscas-brancas em apenas alguns dias de interação com plantas transgênicas de tabaco, alface e feijão, expressando siRNAs para silenciamento do gene

da v-ATPase de *B.tabaci* (THAKUR et al., 2014; IBRAHIM et al., 2015; FERREIRA et al., 2022). Thakur et al. (2014) relataram uma mortalidade de 34 a 85% entre moscas-brancas que se alimentam de discos foliares de tabaco transgênico, após seis dias de interação. Em plantas transgênicas de feijão e alface, possuindo a mesma construção de RNAi utilizada neste trabalho para silenciar o gene v-ATPase de *B.tabaci*, observaram uma mortalidade em torno de 60% em plantas transgênicas de feijão (FERREIRA et al., 2022), resultado similar ao observado neste trabalho em tomate, e uma alta taxa de mortalidade de 83,8 a 98,1%, após cinco dias de interação, em plantas de alface transgênicas (IBRAHIM et al., 2017). Apesar do percentual de mortalidade de moscas-brancas em tomateiros transgênicos ter sido menor ao observado em plantas de alface transgênicas, nossos resultados com esta linhagem de tomate transgênica sugerem um nível razoável de tolerância à praga-alvo, assim como observado para feijão (FERREIRA et al., 2022), apontando para uma ferramenta promissora a ser usada junto a outras estratégias de manejo.

Visto que a eficiência do RNAi depende da dose de siRNA (ou dsRNA) (VOGEL et al., 2019), é necessário considerar a possível degradação dessas moléculas ao serem ingeridas pelos insetos, reduzindo assim a eficiência do silenciamento gênico no organismo-alvo. Luo et al. (2017) demonstrou que dsRNAs, de 370 pb, do gene da proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*), produzidos por tomateiros transgênicos, foram parcialmente degradados quando ingeridos por *B. tabaci*. Além disso, demonstraram, por meio da administração via oral de dietas artificiais, que a maior parte da degradação desses dsRNAs foi suprimida quando foram co-administrados com outros dsRNAs correspondentes a genes de RNases de insetos.

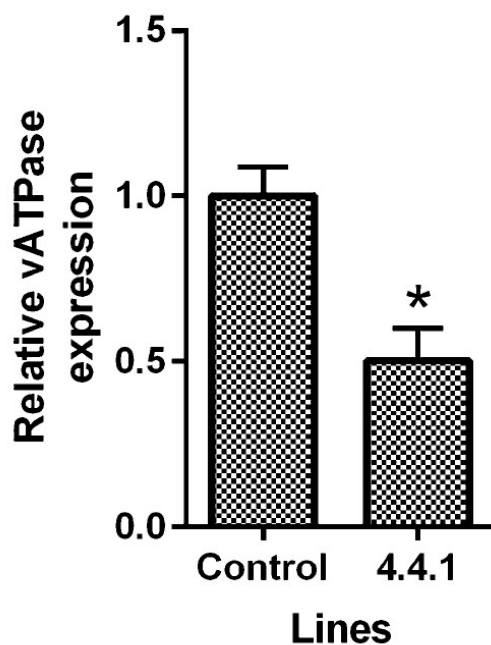
Além da co-supressão dos genes de RNases de insetos para redução da degradação de dsRNAs para os genes-alvo, altos níveis de silenciamento podem ser alcançados por maiores níveis de expressão das construções *intron-hairpin* (LUAN et al., 2013; THAKUR et al., 2014; RAZA et al., 2016; MALIK et al., 2016; IBRAHIM et al., 2017 e XIA et al., 2021).

Neste estudo, o duplo promotor 35 S CaMV foi usado para controlar a expressão do transgene  $\Delta$ ATPase. Desta forma, a utilização de outros promotores pode ser estudada, visando identificar a opção que promova maiores níveis de transcrição e, conseqüentemente, maiores quantidades de dsRNAs em folhas de tomate.

#### 5.1.4- RT-PCR quantitativa (RT- qPCR)

A análise de RT- PCR quantitativa foi realizada para estimar o nível de transcrição do gene endógeno *v-ATPase* em *B. tabaci* alimentando-se das folhas de tomate transgênico da linhagem 4.4.1 (homozigota). Os resultados mostraram que a expressão da *v-ATPase* foi significativamente menor (50,2%;  $P < 0,05$ ) nos insetos interagindo com as plantas transgênicas, quando comparada ao nível observado nos insetos interagindo com plantas não-transgênicas (Figura 18). Resultado similar foi analisado em moscas-brancas interagindo com plantas transgênicas de alface e feijão, possuindo o mesmo cassete de interferência utilizado neste trabalho (IBRAHIM et al., 2017; FERREIRA et al., 2022). Thakur et al. (2014) relataram uma redução de 62% no nível de transcrição de *v-ATPase* em moscas-brancas, após oito dias de interação com plantas transgênicas de tabaco, produzindo siRNAs de  $\Delta ATPase$ .

Tais resultados indicam uma relação causa efeito entre a produção de siRNAs específicos para uma *v-ATPase*, produzidos pela planta hospedeira, e a redução da expressão do gene *v-ATPase* e, conseqüente, interferência na sobrevivência dos insetos que se alimentam dessas plantas.

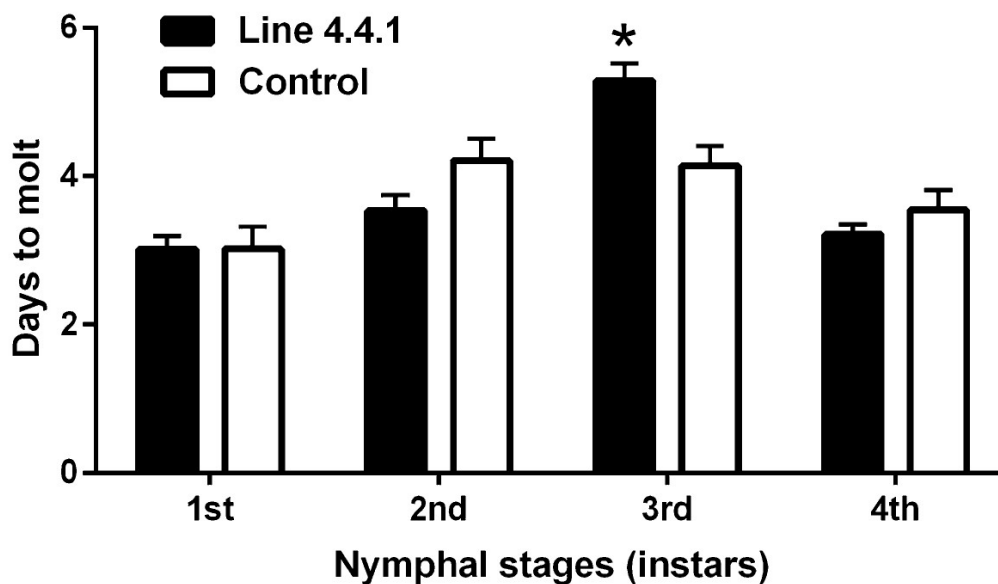


**Figura 18:** Nível de transcrição do gene endógeno *v-ATPase* em moscas-brancas alimentando-se de tomateiros transgênicos da linhagem homozigota 4.4.1 por 48 horas,

determinada por RT-PCR quantitativa. Os dados representam a média de três repetições (\* $p < 0,05$ ,  $n=3$ ).

#### 5.1.5 - Análise de desenvolvimento das moscas-brancas

O tempo de desenvolvimento das moscas-brancas em plantas homozigotas da linhagem 4.4.1 foi semelhante ao das plantas não-transgênicas (controle), exceto no 3º ínstar, que apresentou um tempo significativamente maior na planta transgênica ( $P < 0,05$ ) (Figura 19), sugerindo um leve atraso no estágio de desenvolvimento da ninfa.



**Figura 19:** Tempo de desenvolvimento dos estágios ninfais de *B. tabaci* em plantas homozigotas da linhagem 4.4.1, em comparação com plantas não-transgênicas (\* $p < 0,05$ ,  $n=50-80$ ).

Na análise de mortalidade nos estágios ninfais das moscas-brancas observou uma mortalidade significativamente maior nas plantas transgênicas quando comparadas com as plantas não-transgênicas, apenas no 2º ínstar (Tabela 4).

**Tabela 4:** Mortalidade de insetos por estágio ninfal na linhagem de tomateiro 4.4.1, em comparação com as plantas de tomate controle. N.S: não significativo.

Tomato line/Nymphal stage	Number of dead nymphs / total number of nymphs (% mortality)			
	1st instar	2nd instar	3rd instar	4th instar
4.4.1	2/90 (2.2%)	15/90 (16.7%)	3/90 (3.3%)	1/90 (1.1%)
Control	3/38 (7.9%)	0/38 (0%)	3/38 (7.9%)	0/38 (0%)
Chi-square analysis (p<0.05)	N.S.	* p=0.00739	N.S.	N.S.

\*Significantly different (p<0,05)

N.S Non-significant

Estes resultados sugerem que o desenvolvimento do 2º e 3º instar de *B.tabaci* foi prejudicado pela linhagem transgênica. No trabalho do Ibrahim et al. (2017) verificaram um atraso na eclosão de novos adultos de mosca-branca interagindo com plantas transgênicas de alface, sugerindo um atraso no desenvolvimento e impacto no ciclo de vida dos insetos. Entretanto, não foi observado diferença significativa na sobrevivência e no desenvolvimento dos estágios jovens de moscas-brancas alimentando das linhagens transgênicas de feijão-comum (FERREIRA et al., 2022).

No trabalho de Luan et al. (2013), observaram um atraso no desenvolvimento e uma redução da sobrevivência nos estágios ninfais de moscas-brancas que se alimentaram de dsRNAs específicos, visando o silenciamento de genes da via da ecdisona (*Cyp315a1*, *Cyp18a1*, *EcR* e *E75*) de *B.tabaci*, indicando ser um gene promissor para controle de moscas-brancas nos estágios mais jovens.

A piramidização de genes para silenciamento gênico de múltiplos genes, pode ser uma estratégia interessante para potencializar o controle de moscas-brancas, tanto na fase adulta quanto nos estágios iniciais.

#### 5.1.6 - Análise de atratividade e preferência para oviposição

Na análise de atratividade, não foram observadas diferenças significativas entre plantas transgênicas e não-transgênicas em relação ao número médio de adultos de *B. tabaci* por planta, após 48 horas da liberação dos insetos adultos (p>0.05). No entanto, quanto a análise de preferência para oviposição, observou que o número de ovos por planta foi significativamente menor nas plantas transgênicas, em comparação aos controles (Tabela 5), corroborando com os resultados obtidos, referente à oviposição

inferior em plantas transgênicas de alface e feijão, portadoras da mesma construção de RNAi que usamos no presente trabalho (IBRAHIM et al., 2017; FERREIRA et al., 2022).

A seleção das plantas hospedeiras pelos insetos sugadores, começa com tacs olfativos, o que significa que os insetos avaliam a adequação de uma planta hospedeira principalmente pelos voláteis das plantas (POWELL et al., 2006). Nossos dados mostram que o número de adultos que se estabeleceram nas plantas transgênicas não diferiu das plantas de controle convencionais, sugerindo que os voláteis produzidos por ambas as plantas podem ser semelhantes ou não foram alterados. Entretanto, outros trabalhos mostraram que mesmo quando a atração de adultos não se difere entre os tratamentos, mesmo assim, pode ocorrer uma redução na oviposição (JIAO et al., 2012; LI et al., 2017), sugerindo que a atração de adultos e a preferência pela oviposição não estão necessariamente correlacionadas. A seleção da planta hospedeira para oviposição por insetos pode ser afetada por diferenças na química nutricional e defensiva (BERNAYS; CHAPMAN, 1994), tais como a quantidade de cera nas folhas, presença de tricomas e glucosinolato, acúmulo de ácido salicílico, conteúdo de nitrogênio, carboidrato, compostos fenólicos ou clorofila (ORIANI; VENDRAMIM, 2010; JIAO et al., 2012; MOSHITZKY; MORIN, 2014; UEDA et al., 2019; JAFARBEIGI et al., 2020; ABBASI et al., 2020). Além disso, tratar plantas com produtos químicos, tais como óleos essenciais, aminoácidos ou inseticidas, por exemplo, pode potencialmente reduzir a preferência das moscas-brancas pela oviposição (PRABHAKER et al., 1999; HAMMAD et al., 2001; BALDIN et al., 2007; YANG et al., 2010), sugerindo que essa etapa pode ser reduzida quando as fêmeas percebem um risco potencial para a progênie (MOSHITZKY; MORIN, 2014). Desta forma, a preferência pela oviposição pode se correlacionar com a adequação do hospedeiro ao desempenho de sua prole (hipótese de desempenho de preferência) (JAENIKE, 1978). Portanto, vários fatores podem levar a uma redução na oviposição dos insetos, e assim não podemos descartar o efeito potencial de silenciar um gene envolvido em muitos processos celulares, como o da *v-ATPase*, sendo necessário realizar outras pesquisas para investigar esta hipótese.

**Tabela 5:** Análise de atratividade e preferência para oviposição de moscas-brancas adultas em plantas transgênicas da linhagem 4.4.1, em uma experiência de livre escolha, expressa pelo número de moscas-brancas adultas por planta e o número de ovos postos nas plantas após 48 horas.

Average number of adult insects or eggs per plant ( $\pm$ st error)	Tomato line	
	4.4.1	Control
Adults	2 ( $\pm$ 0.8)	3.9 ( $\pm$ 1.4)
Eggs	22.75 ( $\pm$ 11.4)*	154.5 ( $\pm$ 61.8)

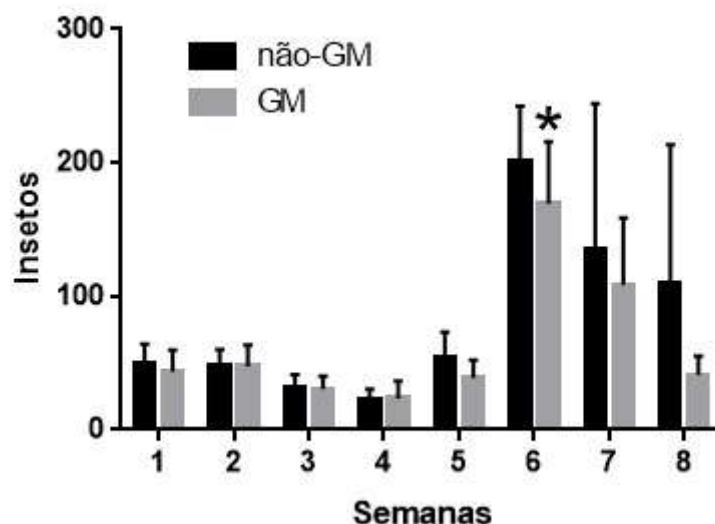
\*Means are significantly different (n=10, p<0.05)

### 5.1.7 Ensaio em casa de vegetação

No ensaio realizado em casa de vegetação, para análise do efeito na população e no ciclo de vida de moscas-brancas alimentadas por plantas transgênicas, expressando siRNAs de  $\Delta ATPase$ , inicialmente, não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos, plantas da linhagem 4.4.1 (em homozigose) e plantas não-transgênicas. Porém, na sexta semana, foi observada uma diferença significativa em relação ao número médio de adultos de *B. tabaci* nos tratamentos (Figura 20).

Os resultados das primeiras semanas (1<sup>a</sup> a 5<sup>a</sup>) reforçam o observado na análise de atratividade, visto que, após a primeira eclosão, a média de adultos por planta não se diferenciou. Entretanto, na segunda eclosão, por volta da sexta semana, o resultado obtido indica que, aparentemente, as moscas tiveram uma preferência para oviposição em plantas não-transgênicas, reforçando o observado no teste de preferência.





**Figura 20:** Análise populacional de moscas-brancas adultas em plantas transgênicas da linhagem 4.4.1, em uma experiência de livre escolha realizada em casa de vegetação, expressa pelo número médio de moscas-brancas adultas, obtidas pela análise amostral (\* $p < 0.05$ , 12 amostras/ bloco (n),  $n = 3$ ).

Neste ensaio também foi observado, nas primeiras semanas, uma diferença significativa, entre os valores médios de blocos localizados em áreas com maior incidência solar na casa de vegetação, indicando a necessidade de controlar esse fator, no planejamento do experimento para melhor eficiência da análise.

#### 5.1.8 Análises em organismos não-alvo

Devido às semelhanças nas sequências do gene *v-ATPase* entre os insetos, duas espécies de insetos: *M. persicae* (Hemiptera: Aphidae) e *T. absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae), que interagem estreitamente com as folhas de tomate, foram escolhidas para um ensaio para análise de efeito em organismos não-alvo. Apesar dessas duas espécies escolhidas serem consideradas insetos-praga para a cultura do tomate, não configurando um problema no manejo de pragas (YAN et al., 2020), o efeito em organismos não-alvo pode afetar a aprovação comercial de culturas geneticamente modificadas.

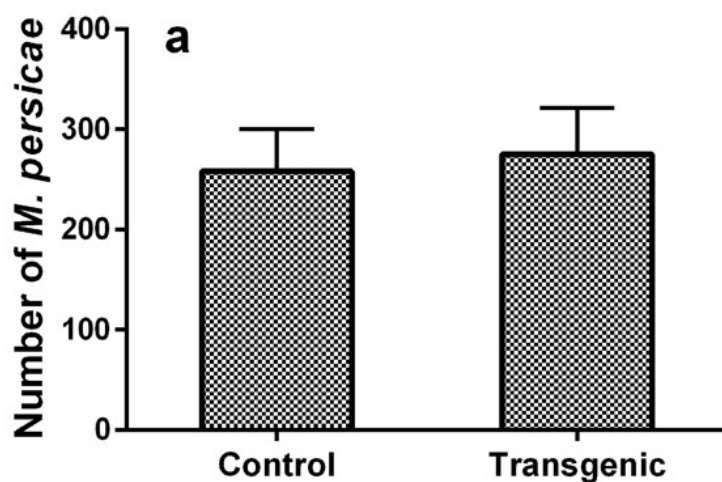
##### 5.1.8.1 Análise in silico de sequências do gene *v-ATPase*

A comparação entre as sequências do gene *v-ATPase* revelaram uma similaridade ao gene *v-ATPase* de *B. tabaci* de 83% para *M. persicae* e 85% para *T. absoluta*. A

comparação *in silico* do gene *v-ATPase* de *B. tabaci* com *M. persicae*, utilizando o software si-Fi (LÜCK et al., 2019), revelou algumas sequências putativas com potencial para um efeito de silenciamento gênico inesperado nesta espécie de inseto não-alvo. No entanto, a análise com *T. absoluta* foi prejudicada visto que, atualmente, apenas algumas sequências incompletas de ATPase de *T. absoluta* estão disponíveis no GenBank (National Center for Biotechnology Information – NCBI).

#### 5.1.8.2 Ensaio com *Myzus persicae*

No ensaio com *M. persicae*, não foram verificadas diferenças significativas no número de progenitores dos insetos alimentando de plantas transgênicas, da linhagem 4.4.1, em comparação com os insetos que se alimentavam de plantas não-transgênicas (Figura 21). Os resultados sugerem que o siRNA produzido pela expressão do transgene  $\Delta ATPase$ , em tomateiros transgênicos, não afetou a expressão dos genes endógenos codificadores de ATPase em *M. persicae*, não afetando na reprodução do pulgão.



**Figura 21:** Média da progênie proveniente de ninfas de *M. persicae* (50 insetos/ replicata) interagindo com tomateiros transgênicos (linhagem 4.4.1) e não-transgênicos (controle).

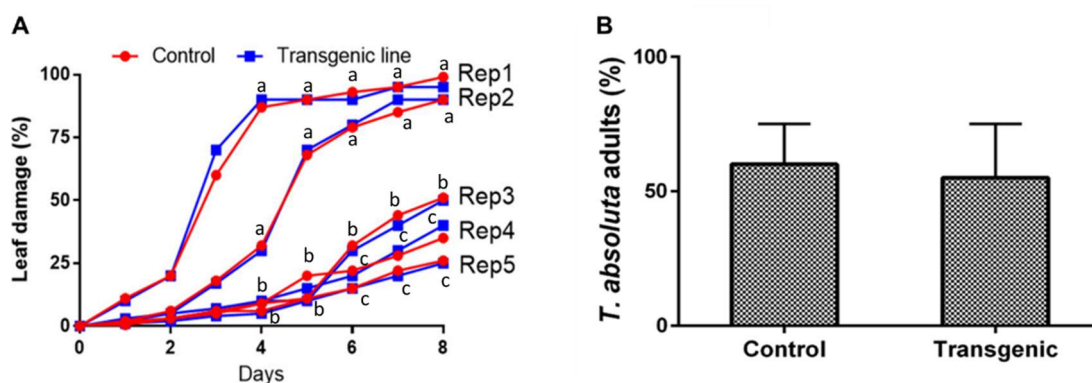
#### 5.1.8.3 Ensaio com *Tuta absoluta*

##### 5.1.8.3.1 Ensaio com *T. absoluta* em folhas destacadas de tomateiro

Para o ensaio de herbivoria de lagartas alimentando de folhas destacadas de tomateiro, foram realizadas duplicatas para cada estágio (instar L1 a L3). Entretanto, não

foi possível analisar uma repetição do controle para lagartas de instar L2 devido à morte prematura, provavelmente, por manuseio das lagartas. De acordo com os resultados obtidos, não foram verificadas diferenças no percentual de dano foliar (Figura 22A), e no percentual de adultos emergentes de *T. absoluta* (Figura 22B), em insetos alimentando-se de folhas da linhagem transgênica 4.4.1 em comparação ao controle.

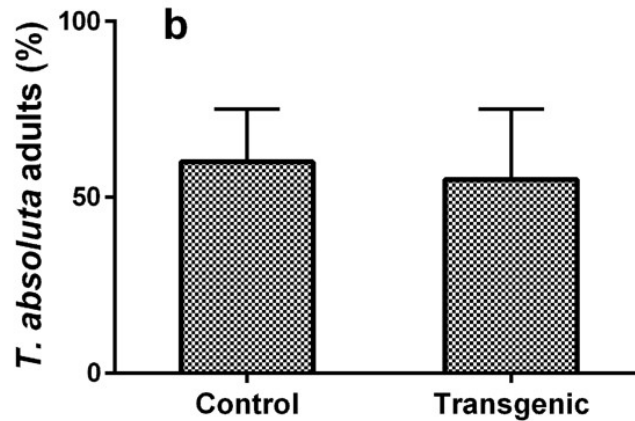
Uma diferença significativa foi observada entre os tratamentos com lagartas do estágio L3 em comparação com lagartas do estágio L1 e L2, a partir do 4º dia de alimentação. Após o 6º dia, observou-se uma diferença significativa entre os diferentes estágios das lagartas utilizadas (L1, L2 e L3). Nos tratamentos utilizando lagartas do estágio L3, o percentual de dano foliar causado foi maior e progrediu mais rapidamente, chegando a 80-90% de dano foliar no 6º dia de alimentação (Figura 22A).



**Figura 22:** Ensaios em organismos não-alvo com folhas destacadas de tomateiros transgênicos (linhagem homozigota 4.4.1) e não-transgênicos para alimentar *T. absoluta*. **(A)** Percentual de dano foliar contabilizado diariamente até o oitavo dia de herbivoria de lagartas de *T. absoluta* **(B)** Percentual de adultos emergentes de *T. absoluta* (\*p < 0.05, n=5).

#### 5.1.8.3.2 Ensaios com *T. absoluta* em plantas de tomate

No ensaio com *T. absoluta* interagindo com plantas de tomate transgênicas (4.4.1 homozigotas) e não-transgênicas, também não foram verificadas diferenças significativas no número de adultos emergentes, indicando que o siRNA produzido pelas plantas transgênicas não apresentou efeito negativo no ciclo de vida da traça do tomateiro (Figura 23).



**Figura 23:** Reprodução média de *T. absoluta* (6 traças/replicata) em tomateiros transgênicos (linhagem 4.4.1) e não-transgênicos (controle).

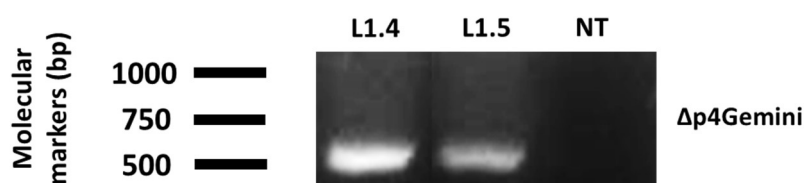
De maneira geral, os ensaios realizados com tomateiros transgênicos para análise de efeito em organismos não-alvo, apesar das semelhanças nas sequências do gene *v-ATPase* de 83% e 85% para *M. persicae* e *T. absoluta*, respectivamente, não observamos nenhum efeito negativo na sobrevivência, desenvolvimento e reprodução dos insetos. Isto sugere que mesmo para os organismos com sequências similares, o silenciamento do gene *v-ATPase* de *B. tabaci* foi específico para a espécie-alvo. No entanto, os estudos de biossegurança devem ser realizados sob condições de campo para determinar o efeito desta linhagem transgênica de tomate sobre um maior número de espécies de insetos.

No trabalho de Xia et al. (2021), também não observaram efeitos negativos nos organismos não-alvo em ensaios conduzidos com *M. persicae* e *Tetranychus urticae* interagindo com plantas transgênicas de tomate resistentes à mosca-branca, devido à expressão de dsRNAs para supressão do gene *BtPMT1*, que permite a neutralização pela mosca-branca da ação tóxica de glicosídeos fenólicos produzidos pela defesa da planta.

Da mesma forma, não foram observados efeitos negativos para os insetos não-alvo, tais como o pulgão preto (*Aphis craccivora*), a larva-minadora (*Liriomyza sp.*) e o parasitoide de ninfas de mosca-branca (*Encarsia formosa*), em plantas transgênicas de feijão-comum expressando siRNAs de  $\Delta$ *ATPase*, mesma sequência utilizada nesse trabalho, reforçando que o silenciamento parcial do gene, provavelmente, foi específico para a mosca-branca.

## 5.2 Linhagens transgênicas obtidas da transformação via *Agrobacterium* com o vetor pCAMBIA 2300-p4-gemini

Dos explantes cotiledonares transformados com o vetor pC2300-p4-gemini, foram obtidas duas plantas transgênicas (L1.4 e L1.5), provenientes de brotos emergidos de um mesmo explante, necessitando realizar outras análises para verificar se são provenientes do mesmo evento de transformação. A presença dos transgenes  $\Delta p4Gemini$  foram confirmadas por PCR (Figura 24).



**Figura 24:** Análise de PCR de duas plantas transgênicas, obtidas de um explante cotiledonar transformado com pC2300-p4-gemini, para confirmação da presença do transgene  $\Delta p4Gemini$ , utilizando um par de primers denominados 4GeminiF e 4GeminiR, resultando na amplificação de um fragmento específico de 577 pb. NT são plantas não-transgênicas.

### 5.2.1 Análise das progênies

Com base nas análises de PCR e no teste de Qui-quadrado, verificou que os transgenes  $\Delta p4Gemini$  e *nptII* co-segregaram na geração T<sub>1</sub> (autopolinização), ajustando-se estreitamente à proporção mendeliana de 3:1, como esperado para um locus de integração (Tabela 6).

**Tabela 6:** Análise de segregação da geração T<sub>1</sub>, proveniente de autopolinização, de plantas transgênicas, obtidas da transformação com o vetor pC2300-p4-gemini.

Lines	Positive <sup>a</sup>	Negative	$\chi^2$	P <sup>b</sup>
1.4	7	3	0,1333	0,7150
1.5	31	11	0,0317	0,8586

(a) Dados baseados em análises de PCR para detecção dos transgenes de  $\Delta p4Gemini$  e *nptII*.

(b) P é a probabilidade que os valores observados reflitam a taxa de segregação 3:1 ( $\alpha = 0,05$ ).

### 5.2.2 Desafio com tomateiros transgênicos transformados para expressar siRNAs de *Δp4Gemini*

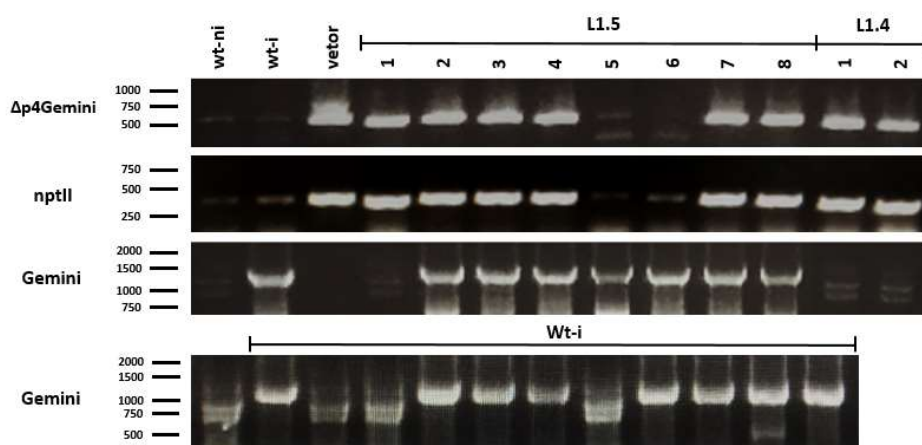
A geração T<sub>1</sub> das plantas transgênicas L1.4 e L1.5 foram desafiadas para análise de resistência ao vírus tomato mottle leaf curl virus (TMoLCV), utilizando como vetor biológico a mosca-branca. Plantas não-transgênicas também foram inoculadas representando o controle. Após 30 dias da inoculação (30-dpi) o DNA das plantas foi extraído e analisado por PCR para detecção de DNA viral e para confirmação da presença dos transgenes *Δp4Gemini* e *nptII*.

As duas plantas desafiadas da linhagem L1.4 foram positivas para a presença de ambos os transgenes (*Δp4Gemini* e *nptII*) e não apresentaram banda para a presença do vírus (Figura 25), permanecendo sem sintomas após 30 dpi (Figura 26B).

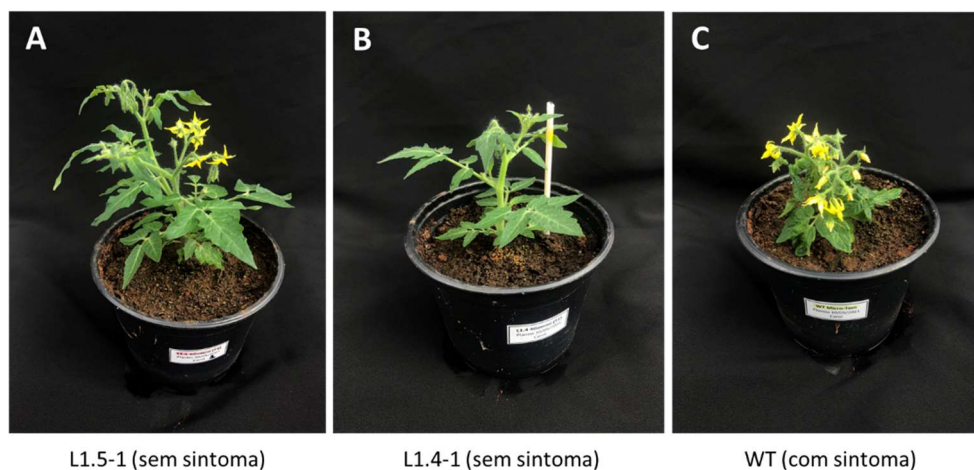
Das oito plantas desafiadas da linhagem L1.5, seis plantas foram positivas e duas negativas para a presença dos transgenes (*Δp4Gemini* e *nptII*). Das plantas transgênicas da linhagem L1.5, apenas uma planta (L1.5-1), não apresentou sintomas (Figura 26A), sem detecção de DNA viral (Figura 25).

Um total de dezoito plantas não-transgênicas foram inoculadas, das quais 83,3% (15/18) das plantas foram positivas para a presença do DNA viral e 16,7% (3/18) das plantas não apresentaram banda para presença do vírus, sendo consideradas escape (Figura 25).

As plantas transgênicas e não-transgênicas positivas para a presença do DNA viral apresentaram sintomas característicos da infecção do vírus TMoLCV, como mosqueado, epinastia foliar e nanismo (Figura 26C).



**Figura 25:** Análises de PCR das plantas inoculadas com o vírus TMoLCV, para detecção dos transgenes *Δp4Gemini* e *nptII*, nas progênes da geração T<sub>1</sub> das linhagens transgênicas (L1.4 e L1.5) e para detecção do begomovírus 30 dias pós-inoculação (dpi). O vetor pC2300-p4-gemini foi utilizado como controle positivo, e como controle negativo foram utilizadas plantas não-transgênicas (wt), não-inoculada (wt-ni) e inoculada (wt-i).



**Figura 26:** Plantas desafiadas com o vírus TMoLCV. (A e B) Plantas transgênicas inoculadas sem a presença de sintomas. (C) Planta não-transgênica inoculada, apresentando sintomas de mosqueado, epinastia foliar e nanismo.

As plantas transgênicas (T<sub>1</sub>) que não apresentaram DNA viral após 30 dpi foram selecionadas para condução de novos ensaios, visando analisar o efeito da zigose dos transgenes no silenciamento dos agentes virais. Visto que, em outros trabalhos utilizando a estratégia de RNAi no controle de viroses, a resistência foi associada à homozigose (CRUZ; ARAGÃO, 2014; ARAGÃO; FARIA 2009). No trabalho reportado por Cruz e Aragão (2014), em plantas transgênicas de feijão-caupi, possuindo RNAi quimérico para silenciamento do gene do cofator da proteinase do vírus cowpea severe mosaic virus (CPSMV) e do gene da proteína capsidial do vírus cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV), foi observada resistência apenas em plantas homozigotas, sendo identificado sintomas leves em plantas heterozigotas. Em plantas transgênicas de feijão, resistentes ao BGMV, devido ao silenciamento do gene *rep*, apenas plantas homozigotas eram imunes ao vírus sobre alta pressão de inóculo viral (ARAGÃO; FARIA, 2009).

Considerando o percentual de plantas consideradas escapes, outros experimentos serão necessários para validar a resistência/tolerância ao agente viral do TMoLCV, sendo

necessário também avaliar a resistência aos demais begomovírus utilizados na construção (ToSRV, TGVV e ToLDV).

Com obtenção das plantas resistentes, ensaios com outras espécies de begomovírus que infectam o tomateiro no Brasil, poderão ser realizados para análise de resistência múltipla.

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados aqui apresentados demonstraram a geração de plantas de tomateiro tolerantes à mosca-branca, mediada pela estratégia de RNAi, devido ao silenciamento parcial, com redução da expressão do gene *v-ATPase* de *B. tabaci*. Uma correlação entre a quantidade de siRNA de  $\Delta ATPase$  e a tolerância aos insetos foi observada. A análise RT-qPCR estabeleceu a relação causa-efeito entre a redução de expressão do gene endógeno *v-ATPase* de *B. tabaci* e a mortalidade dos insetos adultos. Apesar de aparentar ser mais eficaz no controle de insetos adultos, também foram observados maior mortalidade nas ninfas de 2º ínstar e um leve atraso de desenvolvimento de ninfas do 3º ínstar, que se alimentaram da linhagem transgênica. Nenhum efeito negativo foi observado nas espécies não-alvo avaliadas, indicando a especificidade da estratégia utilizada. Tais resultados, podem servir de base para a geração de variedades elite de tomate resistentes à mosca-branca, uma praga devastadora de insetos para cultivos hortícolas. Outros ensaios podem ser realizados em campo, para validação do uso dessas plantas tolerantes à mosca-branca como uma ferramenta adicional no manejo de pragas, assim como, pode ser verificado o impacto do uso dessas plantas na incidência de viroses transmitidas por esse inseto-vetor.

A estratégia de RNAi também foi utilizada como ferramenta para obtenção de plantas resistentes à múltiplas begomovirose. Das plantas inoculadas, algumas apresentaram fenótipo de resistência ao TMoLCV, sem detecção de sintomas e de DNA viral após 30 dias da inoculação. No entanto, novos desafios devem ser realizados para validar a resistência/tolerância ao agente viral do TMoLCV. Visto que a resistência pode estar relacionada à homozigose do transgene e a carga viral utilizada, tais fatores devem ser considerados nos próximos ensaios. Também é necessário desafiar as plantas com outros agentes virais para análise de resistência de amplo espectro à begomovirose. Além disso, ensaios de *Northern blot* devem ser realizados para detecção de moléculas de siRNAs para confirmação da resistência mediada por RNAi.



Visto que a eficiência do mecanismo de RNAi é dependente da quantidade de siRNAs/dsRNAs, outros promotores podem ser estudados visando o aumento da transcrição dessas moléculas, e conseqüentemente, aumentar a resposta de resistência. Neste trabalho, utilizamos o duplo promotor 35S CaMV para controlar a expressão do transgene *ΔATPase* e *Δp4Gemini*, possuindo seqüências-alvo no sentido *sense* e *antisense*, intercaladas pelo intron *Atms-i3*. Desta forma, outros vetores podem ser desenvolvidos para análise e comparação da eficiência e estabilidade do uso de outros promotores e *introns*, que poderão servir como base para outros trabalhos que envolvam a estratégia de silenciamento gênico via RNAi.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, A.; SUFYAN, M.; ARIF, M.J.; SAHI, S.T. Effect of silicon on oviposition preference and biology of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) feeding on *Gossypium hirsutum* (Linnaeus). **International Journal of Pest Management**, v. 68, n. 2, p. 124 -134, 2020. doi: 10.1080/09670874.2020.1802084

AGHARBAOUI, Z.; GREER, A.F.; TABAEIZADEH, Z. Transformation of the wild tomato *Lycopersicon chilense* Dun. by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, v. 15, n. 1, p. 102–105, 1995.

ALVARENGA, M.A.R.; TEIXEIRA, A.S.; CHALFUN, N.N.J. **Produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia**. Lavras: UFLA, 2004. 400p.

ANBINDER, I.; REUVENI, M.; AZARI, R.; PARAN, I.; NAHON, S.; SHLOMO, H.; CHEN, L.; LAPIDOT, M.; LEVIN, I. Molecular dissection of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 119, n. 3, p. 519–530, 2009. doi:10.1007/s00122-009-1060-z

ANDRADE, C.M.; TINOCO, M.L.P.; RIETH, A.F.; MAIA, F.C.O.; ARAGÃO, F.J.L. Host-induced gene silencing in the necrotrophic fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**, v. 65, n. 4, p. 626–632, 2016. doi:10.1111/ppa.12447

ANGAJI, S.A.; HEDAYATI, S.; HOSEIN POOR, R.; SAMAD POOR, S.; SHIRAVI, S.; MADANI, S. Application of RNA interference in plants. **Plant Omics**, v. 3, n. 3, p.77-84, 2010.

ARAGÃO, F.J.L.; FARIA, J.C. First transgenic geminivirus-resistant plant in the field. **Nature Biotechnology**, v. 27, n. 12, p. 1086–1088, 2009. doi:10.1038/nbt1209-1086

ARAGÃO, F.J.L.; IBRAHIM, A.B.; TINOCO, M.L.P. RNA interferente. In: BORÉM, A.; FRITSCH NETO, R. **Ômicas 360º: aplicações e estratégias para o melhoramento de plantas**. Viçosa: Suprema, 2013a. p. 69-94.

ARAGÃO, F.J.L.; NOGUEIRA, E.O.P.L.; TINOCO, M.L.P.; FARIA, J.C. Molecular characterization of the first commercial transgenic common bean immune to the *Bean golden mosaic virus*. **Journal of Biotechnology**, v. 166, n. 1-2, p. 42–50, 2013b. doi:10.1016/j.jbiotec.2013.04.009

ASAD, S.; HARIS, W.A.A.; BASHIR, A.; ZAFAR, Y.; MALIK, K.; MALIK, N.N.; LICHTENSTEIN, C.P. Transgenic tobacco expressing geminiviral RNAs are resistant to the serious viral pathogen causing cotton leaf curl disease. **Archives of Virology**, v. 148, n. 12, p. 2341 – 2352, 2003. doi: 10.1007/s00705-003-0179-5

ATSUSHI, V. Mosca branca: histórico dos surtos e medidas de controle como praga e vetora de vírus. **O Agrônômico**, Campinas, v.53, n.1, p. 22-25, 2001.

BALDIN, E.L.L.; VENDRAMIM, J.D.; LOURENÇÃO, A.L. Interaction between resistant tomato genotypes and plant extracts on *Bemisia tabaci* (Genn.) biotype B. **Scientia Agricola** (Piracicaba. Braz.), v. 64, n. 5, p. 476–481, 2007. doi: 10.1590/S0103-90162007000500004

BAUM, J.A.; BOGAERT, T.; CLINTON, W.; HECK, G.R.; FELDMANN, P.; ILAGAN, O.; JOHNSON, S.; PLAETINCK, G.; MUNYIKWA, T.; PLEAU, M.; VAUGHN, T.; ROBERTS, J. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 1322–1326, 2007. doi: 10.1038/nbt13 59

BERGAMIN-FILHO, A.; INOUE-NAGATA, A. K.; BASSANEZI, R. B.; BELASQUE, J.; AMORIM, L.; MACEDO, M. A.; BARBOSA, J. C.; WILLOCQUET, L.; SAVARY, S. The importance of primary inoculum and area-wide disease management to crop health and food security. **Food Security**, v. 8, p. 221–238, 2016. doi: 10.1007/s12571-015-0544-8

BERNAYS, E.A.; CHAPMAN, R.E. Chemicals in Plants. In: BERNAYS, E.A.; CHAPMAN, R.E. (eds) **Host-Plant Selection by Phytophagous Insects**. Boston: Springer US, 1994. p. 14–60.

BEYENBACH, K.W.; WIECZOREK, H. The V-type H<sup>+</sup> ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 577–589, 2006.

BIAN, X.Y.; THOMAS, M.R.; RASHEED, M.S.; SAEED, M.; HANSON, P.; DE BARRO, P.J.; REZAIAN, M.A. A recessive allele (*tgr-1*) conditioning tomato resistance to geminivirus infection is associated with impaired viral movement. **Phytopathology**, v. 97, n.8, p. 930–937, 2007. doi:10.1094/PHYTO-97-8-0930

BLUM, L.E.B.; CARES, J.E.; UESUGI, C.H. **Fitopatologia: o estudo das doenças de plantas**. Brasília: Otimismo, 2006. 265p.

BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E. de N.; GIORDANO, L.B.; MELO, P.C.T. Melhoramento genético. In: CLEMENTE, F.M.V.T.; BOITEUX, L.S. (eds). **Produção de tomate para processamento industrial**. Brasília: Embrapa, 2012a. 344p. p.17-27.

BOITEUX, L.S.; FONSECA, M.E.N.; VIERA, J.V.; PEREIRA-CARVALHO, R.C. Melhoramento para resistência a doenças virais. In: BORÉM, A.; FRITSCH-NETO, R. **Melhoramento de Plantas para Condições de Estresses Bióticos**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2012b. p. 89-119.

BONDAR, G. **Aleyrodídeos do Brasil: 2. contribuição**. Bahia: Secretaria da Agricultura, 1928. p. 27-34 (Boletim do Laboratório de Patologia Vegetal, 5).

BONFIM, K. **Resistência ao *Bean golden mosaic virus* mediada por RNA interferente em plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*)**. Brasília, DF: Universidade de Brasília, 2007a. 45p. Tese de Doutorado - parcial.

BONFIM, K.; FARIA, J.C.; NOGUEIRA, E.O.P.L.; MENDES, E.A.; ARAGÃO, F.J.L. RNAi-mediated resistance to *Bean golden mosaic virus* in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 6, p. 717–726, 2007b.

BRIDDON, R.W.; PINNER, M.S.; STANLEY, J.; MARKHAM, P.G. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. **Virology**, v. 177, n. 1, p. 85–94, 1990.

BUTTERBACH, P.; VERLAAN, M. G.; DULLEMANS, A.; LOHUIS, D.; VISSER, R. G. F.; BAI, Y.; KORMELINK, R. Tomato yellow leaf curl virus resistance by Ty-1 involves increased cytosine methylation of viral genomes and is compromised by cucumber mosaic virus infection. **PNAS - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.111, n. 35, p. 12942–12947, 2014. doi: 10.1073/pnas.1400894111

BROWN, J.; BIRD, J. Whitefly – Transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. **Plant Disease**, v.76, n.3, p. 220-225, 1992. doi:10.1094/PD-76-0220.

BROWN, J. Evaluación crítica sobre los biotipos de mosca blanca en América, de 1989 a 1992. In: HILJE, L.; ARBOLETA, O. **Las moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en América Central y el Caribe**. Turrialba, Costa Rica: CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza), 1993. p. 1-9.

BROWN, J.K.; FROHLICH, D.R.; ROSELL, R.C. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: Biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? **Annual Review of Entomology**, v. 40, n.1, p. 511-534, 1995a.

BROWN, J.K.; BIRD, J.; BANKS, G.; SOSA, M.; KIESLER, K.; CABRERA, I.; FORNARIS, G. First report of an epidemic in tomato caused by two whitefly-transmitted geminiviruses in Puerto Rico. **Plant Disease**, v. 79, n. 12, p. 1250, 1995b.

BROWN, J.K.; FAUQUET, C.M.; BRIDDON, R.W.; ZERBINI, M.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J. Family Geminiviridae. In: KING, A.M.Q.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B.; LEKOWITZ, E.J. (eds) **Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. London: Elsevier Academic Press, 2012. p. 351–373.

BROWN, J.K.; ZERBINI, F.M.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E.; RAMOS-SOBRINHO, R.; SILVA, J.C.; FIALLO-OLIVE, E.; BRIDDON, R.W.; HERNANDEZ-ZEPEDA, C.; IDRIS, A.; MALATHI, V.G.; MARTIN, D.P.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.; UEDA, S.; VARSANI, A. Revision of *Begomovirus* taxonomy based on pairwise sequence comparisons. **Archives of Virology**, n. 160, p.1593–1619, 2015.

BYRNE, D.N.; BELLOWS JUNIOR, T.S. Whitefly Biology. **Annual Review of Entomology**, v. 36, p. 431-457, 1991.

CHEN, W.; HASEGAWA, D. K.; KAUR, N.; KLIOT, A.; PINHEIRO, P. V.; LUAN, J.; STENSMYR, M.C.; ZHENG, Y.; LIU, W.; SUN, H.; XU, Y.; LUO, Y.; KRUSE, A.; YANG, X.; KONTSEDALOV, S.; LEBEDEV, G.; FISHER, T.W.; NELSON, D.R.; HUNTER, W.B.; BROWN, J.K.; JANDER, G.; CILIA, M.; DOUGLAS, A.E.; GHANIM, M.; SIMMONS, A.M.; WINTERMANTEL, W.M.; LING, K.-S.; FEI, Z. The draft genome of whitefly *Bemisia tabaci* MEAM1, a global crop pest, provides novel insights into virus transmission, host adaptation, and insecticide resistance. **BMC Biology**, v. 14, n. 110, p. 15, 2016. doi:10.1186/s12915-016-0321-y

CHILTON, M.D.; CURRIER, T.C.; FARRAND, S.K.; BENDICH, A.J.; GORDON, M.P.; NESTER, E.W. *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 71, n. 9, p. 3672–3676, 1974.

CHYI, Y.S.; PHILLIPS, G.C. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lycopersicon* based on conditions favorable for regeneration. **Plant Cell Reports**, v. 6, n. 2, p. 105–108, 1987.

COSTA, A.S.; COSTA, C.L.; SAUER, H.F.G. Surto de mosca-branca em culturas do Paraná e São Paulo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.2, n.1, p.20-30, 1973.

COSTA, A.S. Increase in the populational density of *Bemisia tabaci*, a threat of widespread virus infection of legume crops in Brazil. In: BIRD, J.; MARAMOROSCH, K. **Tropical Diseases of Legumes**. New York: Academic Press, 1975. p. 27- 49.

COSTA, M.G.C.; NOGUEIRA, F.T.S.; FIGEIRA, M.L.; OTONI, W.C.; BROMMONSCHENKEL, S.H.; CECON, P.R. Influence of the antibiotic Timentin on plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 3, p. 327–332, 2000.

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum*. **Agronomy**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013. doi:10.4025/actasciagron.v35i3.21251

CRUZ, A.R.R.; ARAGÃO, F.J.L. RNAi-based enhanced resistance to *Cowpea severe mosaic virus* and *Cowpea aphid-borne mosaic virus* in transgenic cowpea. **Plant Pathology**, v. 63, n. 4, p. 831–837, 2014. doi:10.1111/ppa.12178

DARWIN, S. C.; KNAPP, S.; PERALTA, I. E. Taxonomy of tomatoes in the Galápagos Islands: native and introduced species of *Solanum* section *Lycopersicon* (Solanaceae). **Systematics and Biodiversity**, v. 1, n.1, p. 29-53, 2003.

DATLA, R.S.; HAMMERLINDL, J.K.; PELCHER, L.E.; CROSBY, W.L.; SELVARAJ, G. A bifunctional fusion between beta-glucuronidase and neomycin phosphotransferase: a broad-spectrum marker enzyme for plants. **Gene**, v. 101, n. 2, p. 239-246, 1991. doi:10.1016/0378-1119(91)90417-a

DAVIS, M.E.; LINEBERGER, R.D.; MILLER, A.R. Effects of tomato cultivar, leaf age, and bacterial strain on transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 24, n. 2, p. 115-121, 1991a.

DAVIS, M.E.; MILLER, A.R.; LINEBERGER, R.D. Temporal competence for transformation of *Lycopersicon esculentum* (L. Mill.) cotyledons by *Agrobacterium tumefaciens*: relation to wound-healing and soluble plant factors. **Journal of Experimental Botany**, v. 42, n. 3, p. 359-364, 1991b.

DE BARRO, P.J.; LIU, S.S.; BOYKIN, L.M.; DINSDALE, A.B. *Bemisia tabaci*: A statement of species status. **Annual Review of Entomology**, v.56, p. 1–19, 2011.

DE PAULA, N.T. **RNA de interferência como estratégia para controle de begomoviroses**. Brasília, DF: Universidade de Brasília, 2015. 184p. Tese de Doutorado.

DELANNAY, X.; LAVALLE, B.J.; PROKSCH, R.K.; FUCHS, R.L.; SIMS, S.R.; GREENPLATE, J.T.; MARRONE, P.G.; DODSON, R.B.; AUGUSTINE, J.J.; LAYTON, J.G.; FISCHHOFF, D.A. Field performance of transgenic tomato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* insect control protein. **Nature Biotechnology**, v. 7, p. 1265–1269, 1989.

DESBIEZ, C.; DAVID, C.; METTOUCHI, A.; LAUFS, J.; GRONENBORN, B. Rep protein of tomato yellow leaf curl geminivirus has an ATPase activity required for viral DNA replication. **PNAS - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 5640–5644, 1995.

DINSDALE, A.; COOK, L.; RIGINOS, C.; BUCKLEY, Y.M.; DE BARRO, P. Refined global analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) mitochondrial cytochrome oxidase 1 to identify species level genetic boundaries. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 103, n. 2, p. 196–208, 2010. doi: 10.1603/AN09061

DORAIS, M.; EHRET, D.L.; PAPADOPOULOS, A.P. Tomato (*Solanum lycopersicum*) health components: from the seed to the consumer. **Phytochemistry Reviews**, v. 7; p. 231-250, 2008. <https://doi.org/10.1007/s11101-007-9085-x>

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11–15, 1987.

EMBRAPA. **Mosca-branca e as geminiviroses do tomateiro**. Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças. Brasília: DF, 1996.

FAJARDO, T.V.M.; EIRAS, M.; NICKEL, O. **Sintomas de viroses em plantas**. Bento Gonçalves/RS: Embrapa, 2017. 13 p. (Embrapa - Comunicado Técnico, 202).

FARIA, J. C.; BEZERRA, I. C.; ZERBINI, F. M.; RIBEIRO, S. G.; LIMA, M. F. Situação atual das geminiviroses no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, n.2, p.125-137., 2000.

FARIA, J.; ARAGÃO, F.; SOUZA, T.; QUINTELA, E.; KITAJIMA, E.; RIBEIRO, S. Golden Mosaic of Common Beans in Brazil: Management with a Transgenic Approach. **The American Phytopathological Society (APS)**, 2016. doi:10.1094/APSFeature-2016-10

FERREIRA, T.L.; AVIDOS, M.F.D. Mosca-branca, presença indesejável no Brasil. **Biotecnologia – Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, n. 4, p. 22-26, 1998.

FERREIRA, A.L.; FARIA, J.C.; MOURA, M.C.; ZAIDEM, A.L.M.; PIZETTA, C.S.R.; FREITAS, E.O.; COELHO, G.R.C.; SILVA, J.F.A.; BARRIGOSI, J.A.F.; HOFFMANN, L.V.; SOUZA, T.L.P.O.; ARAGÃO, F.J.L.; PINHEIRO, P.V. Whitefly-tolerant transgenic common bean (*Phaseolus vulgaris*) line 22.5. **Frontiers in Plant Science**, 13:984804, 2022. doi: 10.3389/fpls.2022.984804

FIALLO-OLIVÉ, E.; LETT, J.-M.; MARTIN, D.P.; ROUMAGNAC, P.; VARSANI, A.; ZERBINI, F.M.; NAVAS-CASTILLO, J. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Geminiviridae* 2021. **Journal of General Virology**, 102:001696, 2021. Disponível em: <http://www.ictv.global/report/geminiviridae> [Online]. Acesso em: 2021.

FILLATTI, J.J.; KISER, J.; ROSE, R.; COMAI, L. Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. **Nature Biotechnology**, v. 5, p. 726–730, 1987.

FINBOW, M.E.; HARRISON, M.A. The vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase: a universal proton pump of eukaryotes. **Biochemical Journal**, v. 324, p. 697 – 712, 1997.

FIRDAUS, S.; VAN HEUSDEN, A.W.; HIDAYATI, N.; SUPENA, E.D.J.; VISSER, R.G.F.; VOSMAN, B. Resistance to *Bemisia tabaci* in tomato wild relatives. **Euphytica**, v. 187, p.31–45, 2012. doi: 10.1007/s10681-012-0704-2.

FISCHHOFF, D.A.; BOWDISH, K.S.; PERLAK, F.J.; MARRONE, P.G.; MCCORMICK, S.M.; NIEDERMAYER, J.G.; DEAN, D.A.; KUSANO-KRETZMER, K.; MAYER, E.J.; ROCHESTER, D.E; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T. Insect tolerant transgenic tomato plants. **Nature Biotechnology**, v. 5, p. 807–813, 1987.

FLORES, E.; SILBERSCHMIDT, K.; KRAMER, M. Observações de “clorose infecciosa” das malváceas em tomateiros do campo. **O Biológico**, São Paulo, v.26, p.65-69, 1960.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO, 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data> [Online]. Acesso em: 2021.

FORGAC, M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, n. 8, v.11, p. 917-929, 2007. doi:10.1038/nrm2272

FRANÇA, F.H.; VILLAS BÔAS, G.L.; CASTELO BRANCO, M. Ocorrência de *Bemisia argentifolli* Bellows & Perring (Homoptera: Aleyrodidae) no Distrito Federal. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 25, n.2, p.369-372, 1996.

FRARY, A. **The use of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in the map-based cloning of tomato genes and an analysis of factor affecting transformation efficiency**. Ithaca, NY: Cornell University, 1995. 165 p. Tese de Pós doutorado.

FRARY, A.; EARLE, E.D. An examination of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. **Plant Cell Reports**, v. 16, n. 3-4, p. 235-240, 1996.

FUENTES, A.; RAMOS, P.L.; FIALLO, E.; CALLARD, D.; SÁNCHEZ, Y.; PERAL, R.; RODRÍGUEZ, R.; PUJOL, M. Intron-hairpin RNA derived from replication associated protein C1 gene confers immunity to tomato yellow leaf curl virus infection in transgenic tomato plants. **Transgenic Research**, v. 15, n. 3, p. 291–304, 2006. doi:10.1007/s11248-005-5238-0

GEORGE, B.; RUHEL, R.; MAZUMDER, M.; SHARMA, V.K.; JAIN, S.K.; GOURINATH, S.; CHAKRABORTY, S. Mutational analysis of the helicase domain of a replication initiator protein reveals critical roles of Lys 272 of the B9 motif and Lys 289 of the b-hairpin loop in geminivirus replication. **Journal of General Virology**, v. 95, p. 1591–1602, 2014. doi: 10.1099/vir.0.064923-0

GHANIM, M.; MORIN, S.; CZOSNEK, H. Rate of *Tomato yellow leaf curl virus* translocation in the circulative transmission pathway of its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. **Phytopathology**, v. 91, n. 2, p.188–196, 2001.

GHOSH, S.; GHANIM, M. Factors determining transmission of persistent viruses by *Bemisia tabaci* and emergence of new virus–vector relationships. **Viruses**, n.13, v. 9, p. 1808, 2021. <https://doi.org/10.3390/v13091808>

GIORDANO, L.B.; RIBEIRO, C.S.C. Origem, Botânica e Composição Química do Fruto. In: SILVA, J.B.C.; GIORDANO, L.B. (org.) **Tomate para processamento industrial**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia / Embrapa Hortaliças, 2000a. 168p. p.12-17.

GIORDANO, L.B.; DE ÁVILA, A.C.; CHARCHAR, J.M.; BOITEUX, L.S.; FERRAZ, E. ‘Viradoro’: A Tosspovirus-resistant processing tomato cultivar adapted to tropical environments. **HortScience**, v. 35, n. 7, p. 1368-1370, 2000b. doi: 10.21273/HORTSCI.35.7.1368

GIORDANO, L.B.; FONSECA, M.E.N.; SILVA, J.B.C.; INOUE-NAGATA, A.; BOITEUX, L. Efeito da infecção precoce por *Begomovirus* com genoma bipartido em características de frutos de tomate industrial. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 3, p. 815–818, 2005a. doi:10.1590/S0102-05362005000300025

GIORDANO, L.B.; SILVA-LOBO, V.L.; SANTANA F.M.; FONSECA, M.E.N.; BOITEUX L.S. Inheritance of resistance to the bipartite *Tomato chlorotic mottle begomovirus* derived from *Lycopersicon esculentum* cv. ‘Tyking’. **Euphytica**, v. 143, n.1, p. 27–33, 2005b. doi:10.1007/s10681-005-1685-1

GORDON, K.H.J.; WATERHOUSE, P.M. RNAi for insect-proof plants. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 11, p. 1231-1232, 2007. doi:10.1038/nbt1107-1231

GREATHEAD, A.H. Host plants. In: COCK, M.J.W. (ed.). ***Bemisia tabaci*: A Literature Survey on the Cotton Whitefly with an Annotated Bibliography**. C.A.B International Institute of Biological Control, Silkwood Park, 1986. p. 17–26

GUSMÃO, M.R.; PICANÇO, M.C.; GUEDES, R.N.C.; GALVAN, T.L.; PEREIRA, E.J.G. Economic injury level and sequential sampling plan for *Bemisia tabaci* in outdoor tomato. **Journal of Applied Entomology**, v. 130, p.160–166, 2006.

Haji, F. N. P.; DE ALENCAR, J. A.; LIMA, M. F. **Mosca branca: danos, importância econômica e medidas de controle**. Petrolina: Embrapa-CPATSA, 1996a. 9 p. (Embrapa-CPATSA. Documentos, 83).

Haji, F.N.P.; LIMA, M.F.; TAVARES, S.C.C.; DE ALENCAR, J.A.; PREZOTTI, L. **Recomendações fitossanitárias para a cultura do tomate industrial nos perímetros irrigados do Submédio São Francisco – ano agrícola 1996**. Petrolina: Embrapa - CPATSA, 1996b. 8 p. (Embrapa -CPATSA. Comunicado Técnico, 65).

Haji, F.N.P.; DE ALENCAR, J.A.; LIMA, M.F.; MATTOS, M.A. DE A.; HONDA, O.T.; Haji, A.T. **Avaliação de produtos para o controle da mosca-branca (*Bemisia* spp.) na cultura do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**. Petrolina: Embrapa - CPATSA, 1997. 6 p. (Embrapa -CPATSA. Pesquisa em Andamento, 84)

Haji, F.N.P.; MATTOS, M.A. DE A.; DE ALENCAR, J. A.; MOREIRA, A.N. **Aspectos biológicos, danos e estratégias de controle da mosca branca**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2000. 38 p. (Embrapa Semi- Árido. Circular Técnica, 55)

Haji, F.N.P.; FERREIRA, R.C.F.; MOREIRA, A.N. Descrição morfológica, aspectos biológicos, danos e importância econômica. In: Haji, F.N.P.; BLEICHER, E. **Avanços no manejo da mosca-branca *Bemisia tabaci* biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae)**. Petrolina: Embrapa SEMI- ÁRIDO, 2004. p. 21-30.

Haji, F.N.P.; MATTOS, M.A. DE A.; DE ALENCAR, J.A.; BARBOSA, F.R.; PARANHOS, B.J. **Manejo da mosca branca na cultura do tomate**. Petrolina: Embrapa SEMI- ÁRIDO, 2005. 14 p. (Embrapa SEMI- ÁRIDO. Circular Técnica, 81)



HAMILTON, W. D.; BISARO, D. M.; COUTTS, R. H.; BUCK, K. W. Demonstration of the bipartite nature of the genome of a single-stranded DNA plant virus by infection with the cloned DNA components. **Nucleic Acids Research**, v. 11, n. 21, p. 7387–7396, 1983. doi: 10.1093/nar/11.21.7387

HAMMAD, E.M.A-F.; ZOURNAJIAN, H.; TALHOUK, S. Efficacy of extracts of *Melia azedarach* L. callus, leaves and fruits against adults of the sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* (Hom. Aleyrodidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 125, n. 8, p. 483–488, 2001. doi: 10.1046/j.1439-0418.2001.00577.x

HAMZA, S.; CHUPEAU, Y. Re-evaluation of conditions for plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation from tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Journal of Experimental Botany**, v. 44, n. 2, p.1837–1845, 1993.

HANLEY-BOWDOIN, L.; SETTLAGE, S.B.; OROZCO, B.M.; NAGAR, S.; ROBERTSON, D. *Geminiviruses: Models for Plant DNA Replication, Transcription, and Cell Cycle Regulation*. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, p. 71–106, 1999.

HANLEY-BOWDOIN, L.; BEJARANO, E.R.; ROBERTSON, D.; MANSOOR, S. *Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 777-788, 2013. doi:10.1038/nrmicro3117

HANSEN, I.M.; LAPIDOT, L.; THOMMA, B.P.H.J. Emerging Viral Diseases of Tomato Crops. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 23, n. 5, p. 539–548, 2010. doi: 10.1094/MPMI-23-5-0539

HE, Y.-Z.; WANG, Y.M.; YIN, T.Y.; FIALLO-OLIVÉ, E.; LIU, Y.Q.; HANLEY-BOWDOIN, L.; WANG, X.W. A plant DNA virus replicates in the salivary glands of its insect vector via recruitment of host DNA synthesis machinery. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**, v. 117, n. 29, p. 16928–16937, 2020. doi: 10.1073/pnas.1820132117

HEAD, G.P.; CARROLL, M.W.; EVANS, S.P.; RULE, D.M.; WILLSE, A.R.; CLARK, T.L.; STORER, N.P.; FLANNAGAN, R.D.; SAMUEL, L.W.; MEINKE, L.J. Evaluation of SmartStax and SmartStax PRO maize against western corn rootworm and northern corn rootworm: efficacy and resistance management. **Pest Management Science**, v.73, n.9, p.1883-1899, 2017. 1899. doi:10. 1002/ ps. 4554

HEINZ, K.M.; ZALOM, F.G. Variation in trichome-based resistance to *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) oviposition on tomato. **Journal of Economic Entomology**, v.88, n.5, p. 1494-1502, 1995. doi:10.1093/jee/88.5.1494.

HESKETH, E.L.; SAUNDERS, K.; FISHER, C.; POTZE, J.; STANLEY, J.; LOMONOSSOFF, G.P.; RANSON, N.A. The 3.3 Å structure of a plant geminivirus using cryo-EM. **Nature Communications**, v. 9; n. 2369, 2018. doi: 10.1038/s41467-018-04793-6

HILJE, L. Aspectos bioecológicos de *Bemisia tabaci* en Mesoamerica. **Manejo Integrado de Pragas**, n. 35, p. 46-54, 1995.

HILJE, L. Un enfoque preventivo para el manejo sostenible del complejo mosca blanca-geminivirus en tomate. In: **VIII Encontro Latino-Americano e do Caribe sobre Moscas Brancas e Geminivirus**. Recife: Anais Recife: IPA, 1999. p. 27-44.

HU, W.; PHILLIPS, G.C. A combination of overgrowth-control and antibiotics improves *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation efficiency for cultivated tomato (*L. esculentum*). **In Vitro Cellular & Biology – Plant**, v. 37, n. 1, p. 12–18, 2001.

HUTTON, S.F.; SCOTT, J.W.; SCHUSTER, D.J. Recessive resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* from the tomato cultivar Tyking is located in the same region as *Ty-5* on chromosome 4. **HortScience**, v. 47, n. 3, p. 324–327, 2012. doi: 10.21273/HORTSCI.47.3.324

IBRAHIM, A.B. **Resistência a mosca branca (*Bemisia tabaci*) em plantas transgênicas expressando siRNA do gene de uma *v-ATPase***. Brasília, DF: Universidade de Brasília, 2015. 191p. Tese de Doutorado.

IBRAHIM, A.B.; MONTEIRO, T.R.; CABRAL, G.B.; ARAGÃO, F.J.L. RNAi-mediated resistance to whitefly (*Bemisia tabaci*) in genetically engineered lettuce (*Lactuca sativa*). **Transgenic Research**, v. 26, n. 5, p. 613-624, 2017. doi:10.1007/s11248-017-0035-0

INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ - IAPAR. Programa feijão. In: **Relatório técnico anual 1982**. Londrina, PR: IAPAR, 1984. p. 119-157.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2018. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>[Online]. Acessado em: 2018.

INOUE-NAGATA, A. K.; LIMA, M. F.; GILBERTSON, R. L. A review of geminivirus diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. **Horticultura Brasileira**, v. 34, n. 1, p. 8–18, 2016. doi: 10.1590/S0102-053620160000100002

JAENIKE, J. On optimal oviposition behavior in phytophagous insects. **Theoretical Population Biology**, v. 14, n. 3, p. 350–356, 1978. doi: 10.1016/0040-5809(78)90012-6

JAFARBEIGI, F.; SAMIH, M.A.; ALAEI, H.; SHIRANI, H. Induced tomato resistance against *Bemisia tabaci* triggered by salicylic acid,  $\beta$ -aminobutyric acid, and *Trichoderma*. **Neotropical Entomology**, v. 49, n. 3, p. 456–467, 2020. doi: 10.1007/s13744-020-00771-0

JESKE, H.; LUTGEMEIER, M.; PREISS, W. DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of Abutilon mosaic virus. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 21, p. 6158–6167, 2001. doi: 10.1093/emboj/20.21.6158

JESKE, H. Geminiviruses. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 331, p. 185–226, 2009. doi: 10.1007/978-3-540-70972-5\_11

JIAO, X.; XIE, W.; WANG, S.; WU, Q.; ZHOU, L.; PAN, H.; LIU, B.; ZHANG, Y. Host preference and nymph performance of B and Q putative species of *Bemisia tabaci* on three host plants. **Journal of Pest Science**, v. 85, p. 423–430, 2012. doi: 10.1007/s10340-012-0441-2

JINEK, M.; DOUDNA, J.A. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. **Nature**, v. 457, n.7228, p. 405-412, 2009.

JONES, D.R. Plant viruses transmitted by whiteflies. **European Journal of Plant Pathology**, v.109, n. 3, p. 195–219, 2003.

KABIR, M.H.; QADIR, S.A.; HASSAN, S.H.A.; AHN, J.; WANG, M-H. RNAi: An emerging field of molecular research. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 25, p. 4784-4788, 2008.

KHALID, A.; ZHANG, Q.; YASIR, M.; LI, F. Small RNA Based Genetic Engineering for Plant Viral Resistance: Application in Crop Protection. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 43, 2017.

KUMAR, R. V. Classification, Taxonomy and gene function of geminiviruses and their satellites. In: KUMAR, R. V. **Geminiviruses: Impact, Challenges and Approaches**. 1<sup>a</sup> Ed. United Kingdom: Springer, 2019. 235 p. doi: 10.1007/978-3-030-18248-9\_1

LACORTE, C.; ROMANO, E. Transferência de vetores para *Agrobacterium* spp. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-Cenargen, 1998. p. 63-65.

LI, S.J.; XUE, X.; AHMED, M.Z.; REN, S.X.; DU, Y.Z.; WU, J.H.; CUTHBERTSON, A.G.S.; QIU, B.L. Host plants and natural enemies of *Bemisia tabaci* (Hemiptera:Aleyrodidae) in China. **Insect Science**, v.18, n.1, p. 101–120, 2011.

LI, J.; RAO, L.; XIE, H.; SCHREINER, M.; CHEN, L.; LIU, Y. Morphology and glucosinolate profiles of chimeric *Brassica* and the responses of *Bemisia tabaci* in host selection, oviposition and development. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 16, n. 9, p. 2009–2018, 2017. doi: 10.1016/S2095-3119(16)61617-9

LING, H.-Q.; KRISELEIT, D.; GANAL, M. Effect of ticarcillin potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium* mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Plant Cell Reports**, v. 17, n. 11, p. 843–847, 1998.

LIU, S.; JAOUANNET, M.; DEMPSEY, D'M.A.; IMANI, J.; COUSTAU, C.; KOGEL, K-H. RNA-based technologies for insect control in plant production. **Biotechnology Advances**, v. 39, n. 107463, 2020. doi:10.1016/j.biotechadv.2019.107463

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001. doi:10.1006/meth.2001.1262

LOURENÇÃO, A.L.; NAGAI, H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no estado de São Paulo. **Bragantia**, v.53, n.1, p. 53–59, 1994.

LOURO, D. A emergência de vírus transmitidos por moscas brancas, uma ameaça para a horticultura. In: **Actas do 4º Congresso da Sociedade Portuguesa de Fitopatologia**. Faro: Portugal, 2004. p. 4-6.

LSPA - LEVANTAMENTO SISTEMÁTICO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA/ IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2019. In: Sidra - Sistema IBGE de recuperação automática. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>. Acesso em: janeiro de 2020.

LUAN, J.-B.; GHANIM, M.; LIU, S.-S.; CZOSNEK, H. Silencing the ecdysone synthesis and signaling pathway genes disrupts nymphal development in the whitefly. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, n. 8, p.740–746, 2013. doi: 10.1016/j.ibmb.2013.05.012

LÜCK, S.; KRESZIES, T.; STRICKERT, M.; SCHWEIZER, P.; KUHLMANN, M.; DOUCHKOV, D. siRNA-Finder (si-Fi) Software for RNAi-Target Design and Off-Target Prediction. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. 1023, 2019. doi:10.3389/fpls.2019.01023

LUO, Y.; CHEN, Q.; LUAN, J.; CHUNG, S.H.; ECK, J.V.; TURGEON, R.; DOUGLAS, A.E. Towards an understanding of the molecular basis of effective RNAi against a global insect pest, the whitefly *Bemisia tabaci*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 88, p. 21-29, 2017. doi: 10.1016/j.ibmb.2017.07.005

MAJUMDAR, R.; RAJASEKARAN, K.; CARY, J.W. RNA Interference (RNAi) as a Potential Tool for Control of Mycotoxin Contamination in Crop Plants: Concepts and Considerations. **Frontiers in Plant Science**, v. 8:200, 2017. doi: 10.3389/fpls.2017.00200

MALIK, H.J.; RAZA, A.; AMIN, I.; SCHEFFLER, J.A.; SCHEFFLER, B.E.; BROWN, J.K.; MANSOOR, S. RNAi-mediated mortality of the whitefly through transgenic expression of double-stranded RNA homologous to acetylcholinesterase and ecdysone receptor in tobacco plants. **Scientific Reports**, v. 6, n. 38469, 2016. doi:10.1038/srep38469

MAO, Y.B.; CAI, W.J.; WANG, J.W.; HONG, G.J.; TAO, X.Y.; WANG, L.J.; HUANG, Y.P.; CHEN, X.Y. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. **Nature Biotechnology**, v. 25. p.1307–1313, 2007. doi: 10.1038/nbt13 52

MARTIN, J.H.; MOUND, L.A. An annotated check list of the world's whiteflies (Insecta: Hemiptera: Aleyrodidae). **Zootaxa**, v. 1492, n.1, p. 1-84, 2007. doi:10.11646/ZOOTAXA.1492.1.1

MCCORMICK, S.; NIEDERMEYER, J.; FRY, J.; BARNASON, A.; HORSCH, R.; FRALEY, R. Leaf disc transformation of cultivated tomato *L. esculentum* using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**, v. 5, n. 2, p. 81–84, 1986.

MCKENZIE, C.L.; KUMAR, V.; PALMER, C.L.; OETTING, R.D.; OSBORNE, L.S. Chemical class rotations for control of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) on poinsettia and their effect on cryptic species population composition. **Pest Management Science**, v.70, p. 1573–1587, 2014.

MELO, P.C.T. **Mosca branca ameaça produção de hortaliças**. Campinas: Asgrow do Brasil Sementes, 1992. 2p. (Informe Técnico).

MENEZES JUNIOR, A.O.; SUGAWARA, L.M.; PEREIRA, R.A.S.; GALLEGOS, D. M.N. Parasitismo da mosca branca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Homoptera: Aleyrodidae) em diferentes plantas hospedeiras, na região de Londrina - PR. In: **5º SICONBIOL - Simpósio de Controle Biológico**. Foz do Iguaçu: Anais do 5º SICONBIOL, 1996. p. 34-34.

MICHEREFF FILHO, M.; INOUE-NAGATA, A. K. **Guia para o reconhecimento e manejo da mosca-branca, da geminivirose e da crinivirose na cultura do tomateiro**. Brasília: Embrapa, 2015. 16p. (Embrapa Hortaliças. Circular técnica, 142).

MOFFAT, A.S. Geminiviruses emerge as serious crop threat. **Science**. v. 286, p. 1835, 1999.

MOREIRA, A.N.; HAJI, F.N.P.; SANTOS, A.P. dos; HAJI, A.T.; BARBOSA, F.R.; ALENCAR, J.A. de. Aspectos biológicos de *Bemisia argentifolii* em tomateiro no Submédio do Vale do São Francisco. In: **VIII Encontro Latino-Americano e do Caribe sobre Moscas Brancas e Geminivírus**. Recife: Anais e mini-resumos. Recife: IPA, 1999. 75p.

MOSHITZKY, P.; MORIN, S. *Bemisia tabaci* females from the Mediterranean (Q) species detect and avoid laying eggs in the presence of pyriproxyfen, a juvenile hormone analogue. **Pest Management Science**, v. 70, n. 10, p. 1468–1476, 2014. doi: 10.1002/ps.3698

MOURA, A. P. de; MICHEREFF FILHO, M.; GUIMARAES, J. A.; LIZ, R. S. **Manejo integrado de pragas do tomateiro para processamento industrial**. Brasília: Embrapa, 2014. 24p. (Embrapa Hortaliças. Circular técnica, 129).

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 4, p. 473–497, 1962.

NARANJO, S.E.; CASTLE, S.J.; DE BARRO, P.J.; LIU, S.S. Population dynamics, demography, dispersal and spread of *Bemisia tabaci*. In: STANSLY, P.A.; NARANJO, S.E. **Bemisia: Bionomics and Management of Global Pest**. New York: Springer, 2010. p. 185–226.

NARANJO, S.E.; ELLSWORTH, P.C. Methodology for developing life tables for sessile insects in the field using the whitefly, *Bemisia tabaci*, in cotton as a model system. **Journal of Visualized Experiments**, v. 129, e56150, p. 12, 2017. doi:10.3791/56150

NASH, T.E.; DALLAS, M.B.; REYES, M.I.; BUHRMAN, G.K.; ASCENCIO-IBAÑEZ, J.T.; HANLEY-BOWDOIN, L. Functional analysis of a novel motif conserved across geminivirus Rep proteins. **Journal of Virology**, v. 85, n. 3, p. 1182–1192., 2011. doi:10.1128/JVI.02143-10

NAVAS-CASTILLO, J.; FIALLO-OLIVÉ, E.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, p. 219–248, 2011. doi:10.1146/annurev-phyto-072910-095235

NAWAZ-UL-REHMAN, M.S.; FAUQUET, C.M. Evolution of geminiviruses and their satellites. **FEBS Letters**, v. 583, n. 12, p. 1825 – 1832, 2009. doi:10.1016/j.febslet.2009.05.045

NEIVA, I.P.; ANDRADE JÚNIOR, V.C.; MALUF, W.R.; OLIVEIRA, M.C.; MACIEL, G.M. Role of allelochemicals and trichome density in the resistance of tomato to whitefly. **Agricultural Sciences**, v. 37, n. 1, 2013. doi:10.1590/S1413-70542013000100007

NEIVA, I.P.; SILVA, A.A.; RESENDE, J.F.; CARVALHO, R.C.; OLIVEIRA, A.M.S.; MALUF, W.R. Tomato genotype resistance to whitefly mediated by allelochemicals and Mi gene. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 79, n. 1, p.124–130, 2019. doi:10.4067/S0718-58392019000100124

NELSON, N.; HARVEY, W.R. Vacuolar and plasma membrane proton-adenosinetriphosphatases. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 2, p. 361–385, 1999.

NELSON, N.; PERZOV, N.; COHEN, A.; HAGAI, K.; PADLER, V.; NELSON, H. The cellular biology of proton-motive force generation by v-ATPases. **The Journal of Experimental Biology**, v. 203, p. 89-95, 2000.

OBBARD, D.J.; GORDON, K.H.J; BUCK, A.H.; JIGGINS, F.M. The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n.1513, p. 99–115, 2009. doi: 10.1098/rstb.2008.0168

OLIVEIRA, M.R.V; HENNEBERRY, T.J.; ANDERSON, P. History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. **Crop Protection**, v.20, n.9, p. 709–723, 2001.

ORIANI, M.A. DE G.; VENDRAMIM, J.D. Influence of trichomes on attractiveness and ovipositional preference of *Bemisia tabaci* (Genn) B biotype (Hemiptera: Aleyrodidae) on tomato genotypes. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 6, p. 1002–1007, 2010. doi: 10.1590/S1519-566X2010000600024

OROZCO, B.M.; HANLEY-BOWDOIN, L. Conserved sequence and structural motifs contribute to the DNA binding and cleavage activities of a geminivirus replication protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 38, p. 24448–56, 1998.

OROZCO, B.M.; KONG, L.J.; BATTS, L.A.; ELLEDGE, S.; HANLEY-BOWDOIN, L. The multifunctional character of a geminivirus replication protein is reflected by its complex oligomerization properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p.6114–6122, 2000.

PARK, S.H.; MORRIS, J.L.; PARK, J.E.; HIRSCHI, K.D.; SMITH, R.H. Efficient and genotype-independent *Agrobacterium*-mediated tomato transformation. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, n. 10, p. 1253–1257, 2003.

PATIL, R.S. **Genetic manipulation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) for crop improvement**. Nottingham: University of Nottingham, 1994. 253 p. Tese de Pós Doutorado.

PEREIRA-CARVALHO, R.C.P.; TOBAR, L.L.M.; DIANESE, E.; FONSECA, M.E.N.; BOITEUX, L.S. Melhoramento genético do tomateiro para resistência a doenças de etiologia viral: Avanços e perspectivas. **Revisão Anual de Patologia de plantas**, v. 22, p.280-361, 2014.

PERRING, T.M.; STANSLY, P.A.; LIU, T.X.; SMITH, H.A.; ANDREASON, S. A. Whiteflies: Biology, Ecology, and Management. In: WAKIL, W.; BRUST, G.E.; PERRING, T.M. **Sustainable Management of Arthropod Pests of Tomato**. Academic Press - Elsevier Science, 2018. p.73-110. 372p.

POLSTON, J.E.; ANDERSON, P.K. The emergence of whitefly transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. **Plant Disease**, v. 81, p. 1358–1369, 1997.

POWELL, G.; TOSH, C.R.; HARDIE, J. Host plant selection by aphids: Behavioral, evolutionary, and applied perspectives. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 309–330, 2006. doi: 10.1146/annurev.ento.51.110104.151107

PRABHAKER, N.; TOSCANO, N.C.; HENNEBERRY, T.J. Comparison of neem, urea, and amitraz as oviposition suppressants and larvicides against *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 92, n. 1, p. 40–46, 1999. doi: 10.1093/jee/92.1.40

QIU, D.; DIRETTO, G.; TAVARZA, R.; GIULIANO, G. Improved protocol for *Agrobacterium* mediated transformation of tomato and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic gene *CsZCD*. **Scientia Horticulturae**, v.112, n.2, p. 172–175, 2007.

QUIRINO, T.R. Agricultura e meio ambiente: tendência. In: SILVEIRA, M. A.; VILELA, S. L. O. **Globalização e sustentabilidade da agricultura**. Jaguariúna, SP: Embrapa - CNPMA, Documento, 15, 1998. p. 109-138

RAJ, S.K.; SINGH, R.; PANDEY, S.K.; SINGH, B.P. *Agrobacterium*-mediated tomato transformation and regeneration of transgenic lines expressing *Tomato leaf curl virus* coat protein gene for resistance against TLCV infection. **Current Science**, v. 88, n. 10, p. 1674–1679, 2005.

RAZA, A.; MALIK, H.J.; SHAFIQ, M.; AMIN, I.; SCHEFFLER, J.A.; SCHEFFLER, B.E.; MANSOOR, S. RNA Interference based Approach to Down Regulate Osmoregulators of Whitefly (*Bemisia tabaci*): Potential Technology for the Control of Whitefly. **PLoS One**, v. 11, n. 4, e0153883, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0153883

REIS, L.; FONSECA, M. E. N.; RIBEIRO, S. G.; NAITO, F. Y. B.; BOITEUX, L. S.; PEREIRA-CARVALHO, R.C. Metagenomics of neotropical single-stranded DNA viruses in tomato cultivars with and without the *Ty-1* gene. **Viruses**, v. 12, n. 8, p. 819, 2020.

RIBEIRO, S.G.; MELO, L.V.; BOITEUX, L.S.; KITAJIMA, E.W; FARIA, J.C. Tomato infection by a geminivirus in the Federal District, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, p. 330, 1994.

RIZVI, I.; CHOUDHURY, N.R.; TUTEJA, N. Insights into the functional characteristics of geminivirus rolling-circle replication initiator protein and its interaction with host factors affecting viral DNA replication. **Archives of Virology**, v. 160, p. 375-387, 2014. doi: 10.1007/s00705-014-2297-7

ROJAS, M.R. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease**, v. 77, n. 4, p. 340, 1993. doi:10.1094/PD-77-0340

RUAN, J.; STORMO, G.D.; ZHANG, W. ILM: a web server for predicting RNA secondary structures with pseudoknots. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 2, p. 146–149, 2004. doi: 10.1093/nar/gkh444

RUHEL, R.; CHAKRABORTY, S. Multifunctional roles of geminivirus encoded replication initiator protein. **VirusDisease**, v. 30, n. 1, p.66–73, 2019. doi: 10.1007/s13337-018-0458-0

SALAS, J.; MENDOZA, O. Biology of the sweetpotato whitefly (Homoptera: *Aleyrodidae*) on tomato. **The Florida Entomologist**, v. 78, n.1, p. 154-160, 1995.

SALGUERO, V. Perspectivas para el manejo del complejo mosca blanca - virosis. In: HILJE, L.; ARBOLEDA, O. **Las moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en America Central y Caribe**. Turrialba: CATIE, 1993. p.20-26. (CATIE. Informe Técnico, 205).

SEAL, S.E.; VANDENBOSCH, F.; JEGER, M.J. Factors influencing *Begomovirus* evolution and their increasing global significance: implications for sustainable control. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v. 25, n. 1, p. 23–46, 2006. doi:10.1080/07352680500365257



SHAH, M.M.R.; LIU, T.X. Feeding experience of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) affects their performance on different host plants. **PLoS One**, v.8, n.10, e77368, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0077368

SIJEN, T.; FLEENOR, J.; SIMMER, F.; THIJSEN, K.L.; PARRISH, S.; TIMMONS, L.; PLASTERK, R.H.A.; FIRE, A. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. **Cell**, v. 107, n. 4, p. 465-476, 2001. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00576-1

SILVA, K. F.; MICHEREFF-FILHO, M.; FONSECA, M. E. N.; SILVA-FILHO, J. G.; TEXEIRA, A. C.; MOITA, A. W.; TORRES, JB.; FERNÁNDEZ-MUÑOZ, R.; BOITEUX, L. S. Resistance to *Bemisia tabaci* biotype B of *Solanum pimpinellifolium* is associated with higher densities of type IV glandular trichomes and acylsugar accumulation. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 151, n. 3, 218-230, 2014.

SMITH, N.A.; SINGH, S.P.; WANG, M.-B.; STOUTJESDIJK, P.A.; GREEN, A.G.; WATERHOUSE, P.M. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. **Nature**, v. 407, p. 319–320, 2000. doi:10.1038/35030305

STEVENS, T.H.; FORGAC, M. Structure, function and regulation of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 13, p. 779-808, 1997.

STEVENS, M.A. Introduction. In: DAVIS, R.M.; PERNEZNY, K.; BROOME, J.C. **Tomato Health Management**. (ed.) American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 2012. 191p. p. 1-12.

SUN, H.J.; UCHII, S.; WATANABE, S.; EZURA, H. A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. **Plant Cell Physiology**, v. 47, n. 3, p. 426–431, 2006. doi: 10. 1093/ pcp/ pci251

SWEVERS, L.; SMAGGHE, G. Use of RNAi for control of insect crop pests. In: SMAGGHE, G.; DIAZ, I. (eds) **Arthropod-plant interactions: novel insights and approaches for IPM, Progress in Biological Control**, v. 14, Netherlands, 2012, p. 177–197. doi:10.1007/978-94-007-3873-7\_7

TABAEIZADEH, Z.; AGHARBAOUI, Z.; HARRAK, H.; POYSA, V. Transgenic tomato plants expressing a *Lycopersicon chilense* chitinase gene demonstrate improved resistance to *Verticillium dahliae* race 2. **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 2, p. 197–202, 1999.

THAKUR, N.; UPADHYAY, S.K.; VERMA, P.C.; CHANDRASHEKAR, K.; TULI, R.; SINGH, P.K. Enhanced whitefly resistance in transgenic tobacco plants expressing double stranded RNA of *v-ATPase* A gene. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 9 p., 2014. doi:10.1371/journal.pone.0087235

TINOCO, M.L.P.; DIAS, B.B.A.; DALL'ASTTA, R.C.; PAMPHILE, J.A.; ARAGÃO, F.J.L. In vivo trans-specific gene silencing in fungal cells by in planta expression of a double-stranded RNA. **BMC Biology**, v. 8, n. 27, p. 27. 2010.

TOLOY, R.S.; MITUTI, T.; FREITAS, D.M.S.; MALUTA, N.K.P.; SILVA, T.N.Z.; LOPES, J.R.S.; FERERES, A.; REZENDE, J.A.M. Features of the relationship between *Tomato severe rugose begomovirus* and *Bemisia tabaci* MEAM1 reveal that the virus is acquired during a probe lasting only one minute. **European Journal of Plant Pathology**, v. 151, p. 541-547, 2017. doi: 10.1007/s10658-017-1388-1.

UEDA, H.; KUGIMIYA, S.; TABATA, J.; KITAMOTO, H.; MITSUHARA, I. Accumulation of salicylic acid in tomato plant under biological stress affects oviposition preference of *Bemisia tabaci*. **Journal of Plant Interactions**, v. 14, n. 1, p. 73–78, 2019. <https://doi.org/10.1080/17429145.2018.1550220>

UPADHYAY, S.K.; CHANDRASHEKAR, K.; THAKUR, N.; VERMA, P.C.; BORGIO, J.F.; SINGH, P.K.; TULI, R. RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route. **Journal of Biosciences**, v. 36, n. 1, p. 153–161, 2011. doi:10.1007/s12038-011-9009-1

VAN ROEKEL, J.S.; DAMM, B.; MELCHERS, L.S.; HOEKEMA, A. Factors influencing transformation frequency of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Plant Cell Reports**, v. 12, n. 11, p. 644–647, 1993.

VARSANI, A.; NAVAS-CASTILLO, J.; MORIONES, E.; HERNÁNDEZ-ZEPEDA, C.; IDRIS, A.; BROWN, J.K.; MURILO ZERBINI, F.; MARTIN, D.P. Establishment of three new genera in the family *Geminiviridae*: *Beurtovirus*, *Eragrovirus* and *Turncurtovirus*. **Archives of Virology**, v. 159, p. 2193–2203, 2014. doi:10.1007/s00705-014-2050-2.

VIDAVSKI, F.; CZOSNEK, H.; GAZIT, S.; LEVY, D.; LAPIDOT, M. Pyramiding of genes conferring resistance to Tomato yellow leaf curl virus from different wild tomato species. **Plant Breeding**. v. 127, n. 6, p. 625–631, 2008. doi:10.1111/j.1439-0523.2008.01556.x

VIDYA, C.S.S.; MANOHARAN, M.; KUMAR, C.T.R.; SAVITHRI, H.S.; SITA, G.L. Agrobacterium-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* var. Pusa Ruby) with coat-protein gene of *Physalis mottle tymovirus*. **Journal of Plant Physiology**, v. 156, n. 1, p. 106–110, 2000.

VILLAS BÔAS, G.L.; CASTELO BRANCO, M. **Manejo integrado de mosca-branca (*Bemisia tabaci* biótipo B) em sistemas de produção integrada de tomate indústria (PITI)**. Brasília: Embrapa, 2009. 16 p. (Embrapa Hortaliças. Circular técnica, 70)

VOGEL, E.; SANTOS, D.; MINGELS, L.; VERDONCKT, T.W.; BROECK, J.V. RNA interference in insects: Protecting beneficials and controlling pests. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 1912, 2019. doi:10.3389/fphys.2018.01912

VOORBURG, C.M.; YAN, Z.; BERGUA-VIDAL, M.; WOLTERS, A.-M.A.; BAI, Y.; KORMELINK, R. Ty-1, a universal resistance gene against geminiviruses that is compromised by co-replication of a betasatellite. **Molecular Plant Pathology**, v. 21, n. 2, p.160–172, 2020. doi: 10.1111/mpp.12885

WANG, M.B.; ABBOTT, D.C.; WATERHOUSE, P.M. A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus. **Molecular Plant Pathology**, v. 1, n. 6, p. 347-356, 2000.

XIA, J.; GUO, Z.; YANG, Z.; HAN, H.; WANG, S.; XU, H.; YANG, F.; WU, Q.; XIE, W.; ZHOU, X.; DERMAUW, W.; TURLINGS, T.C.J.; ZHANG, Y. Whitefly hijacks a plant detoxification gene that neutralizes plant toxins. **Cell**, v. 184, p. 1–13, 2021. doi: 10.1016/j.cell.2021.02.014

YAN, S.; REN, B.; ZENG, B.; SHEN, J. Improving RNAi efficiency for pest control in crop species. **Biotechniques**, v. 68, n. 5, p.283–290, 2020. doi: 10. 2144/ btn- 2019- 0171

YAN, Z.; WOLTERS, A-. M. A; NAVAS-CASTILLO, J.; BAI, Y. The Global Dimension of Tomato Yellow Leaf Curl Disease: Current Status and Breeding Perspectives. **Microorganisms**, v. 9, n. 4, 740, 2021. doi: 10.3390/microorganisms9040740

YANG, N-W.; LI, A-L.; WAN, F-H.; LIU, W-X.; JOHNSON, D. Effects of plant essential oils on immature and adult sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* biotype B. **Crop Protection**, v. 29, n. 10, p. 1200–1207, 2010. doi: 10.1016/j.cropro.2010.05.006

YOO, B.C.; KRAGLER, F.; VARKONYI GASIC, E.; HAYWOOD, V.; ARCHER EVANS, S.; LEE, Y.M.; LOUGH, T.J.; LUCAS, W. J. A systemic small RNA signaling system in plants. **Plant Cell**, v. 16, p. 1979-2000, 2004. doi:10.1105/tpc.104.023614

ZEIST, A.R.; SILVA, A.A.; RESENDE, J.T.V.; MALUF, W.R.; GABRIEL, A.; ZANIN, D.S.; GUERRA, E.P. Tomato breeding for insect-pest resistance. In: NYAKU, S.T.; DANQUAH, A. (eds) **Recent advances in tomato breeding and production**. InTech Open Science, London, 2018, p. 79–88. doi:10.5772/intechopen.75978

ZEIST, A.R.; RESENDE, J.T.V.; PERRUD, A.C.; GABRIEL, A.; MALUF, W.R.; ARANTES, J.H.V.; YOUSSEF, K. Resistance to *Bemisia tabaci* in tomato species and hybrids and its association with leaf trichomes. **Euphytica**, v. 217, n. 5, pp.85, 2021. doi: org/10.1007/s10681-021-02815-x

ZERBINI, F. M.; BRIDDON, R.W.; IDRIS, A.; MARTIN, D. P.; MORIONES, E.; NAVAS-CASTILLO, J.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.; ROUMAGNAC, P.; VARSANI, A. ICTV Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae. **Journal of General Virology**, v. 98, p. 131–133, 2017. doi 10.1099/jgv.0.000738



# RNA interference-mediated tolerance to whitefly (*Bemisia tabaci*) in genetically engineered tomato

Carolina Senhorinho Ramalho Pizetta<sup>1,2</sup> · William Rafael Ribeiro<sup>3,4</sup> · Amanda Lopes Ferreira<sup>3,4</sup> · Matheus da Costa Moura<sup>3,4</sup> · Kenny Bonfim<sup>1</sup> · Patrícia Valle Pinheiro<sup>3</sup> · Glaucia Barbosa Cabral<sup>1</sup> · Francisco José Lima Aragão<sup>1,2</sup>

Received: 31 August 2021 / Accepted: 17 October 2021 / Published online: 25 October 2021  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2021

## Abstract

Whitefly (*Bemisia tabaci*) is a polyphagous insect that causes huge damage in several horticultural crops, including tomato, by sucking nutrients from the phloem and transmitting viruses. Whiteflies are particularly difficult to manage and the use of chemicals remains the common practice, which causes the development of insecticidal resistance. Thus, there is considerable interest in the introduction of resistance to whitefly by classical and molecular breeding. Here, we explored the concept of using an RNA interference construct to silence a v-ATPase gene in whiteflies interacting with transgenic tomato plants that express siRNA molecules corresponding to a fragment from the *B. tabaci* vATPase. PCR analyses revealed the presence of both  $\Delta$ ATPase and *nptII* transgenes in all transgenic lines. siRNA expressing lines were challenged against whitefly and revealed a mortality rate of 57.1% in transgenic line 4.4.1, while in the control the mortality was 7.6%. Mortality of 2nd instar nymphs was higher on the transgenic plants and the development of 3rd instar nymphs was slightly longer than on the control plants. Although the attraction of insects was not significantly different between treatments, the number of eggs laid by the insects on the transgenic plants was significantly lower, compared to the controls. RT-qPCR revealed a decreased expression level of endogenous v-ATPase gene in whiteflies feeding on transgenic plants. No unexpected effect was observed on the non-target insects *Myzus persicae* or *Tuta absoluta*. Results presented here may form the foundation for the generation of elite tomato varieties resistant to whitefly, a devastating insect pest.

## Key message

Genetically modified tomato was generated to express a vATPase small interfering RNA. Transgenic plants were tolerant to whiteflies (*Bemisia tabaci*) and revealed no effect on *Myzus persicae* and *Tuta absoluta*.

**Keywords** ATPase · Insect resistance · *Myzus persicae* · RNAi · Transgenic plants · *Tuta absoluta*

## Abbreviations

35SCaMV	35 S promoter from the cauliflower mosaic virus.
AChE	Acetylcholinesterase.
AMV	Alfalfa mosaic virus.
Atms-i3	Intron 3 of the malate synthase gene from <i>Arabidopsis thaliana</i> .
ATP	Adenosine triphosphate.
B5	Basal salt mixture containing micro and macro elements with vitamins as described by Gamborg et al. (1968)
BAP	6-Benzylaminopurine.
cDNA	Complementary DNA.
dsRNA	Double-stranded RNA.
EcR	Ecdysone receptor.

Communicated by Sergio J. Ochatt.

✉ Francisco José Lima Aragão  
francisco.aragao@embrapa.br

- <sup>1</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB W5 Norte, 70770-900 Brasília, DF, Brazil
- <sup>2</sup> Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Campus Universitário, 70910-900 Brasília, DF, Brazil
- <sup>3</sup> Embrapa Arroz e Feijão, Rod. GO-462, km 12 Zona Rural C.P. 179, 75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO, Brazil
- <sup>4</sup> Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia, Campus Samambaia, 74690-900 Goiânia, GO, Brazil

EHA105	Elizabeth Hood <i>Agrobacterium</i> 105.
hpRNA	Hairpin RNA.
IAA	Indole-3-acetic acid.
IBA	Indole-3-butyric acid.
MEAM1	Middle East Asia Minor – 1 = Biotype B.
miRNA	MicroRNA.
mtCOI	Mitochondrial cytochrome oxidase I.
NPTII	Neomycin Phosphotransferase II.
PVP	Polyvinylpyrrolidone.
RNAi	RNA interference.
siRNA	Small interfering RNAs.
vATPase	Vacuolar ATPase.

## Introduction

Tomato (*Solanum lycopersicum*) is one of the most important vegetable plants in the world, with global production estimated as 180 million tons (FAOSTAT 2019, <http://www.fao.org/faostat/>); due to its nutritional importance as food and source of health-promoting compounds, and to the balanced mixture of minerals and antioxidants (Dorais et al. 2008). However, its production is affected by a diversity of insect pests and diseases. Among them, whiteflies (*Bemisia tabaci*) and whitefly-transmitted viruses present some of the most important constraints worldwide.

Whitefly is recognized as a complex of cryptic species. It is a polyphagous insect that causes huge damage in hundreds of host species, including horticultural crops, such as tomato, lettuce, eggplant, cauliflower, and cucumber (Greathead 1986; Oliveira et al. 2001; Shah and Liu 2013). Besides sucking nutrients from the phloem, which results in accumulation of toxic molecules leading to plant breakdown, *B. tabaci* transmits several plant viruses, such as begomoviruses (*Geminiviridae*), criniviruses (*Closteroviridae*), and torradoviruses (*Secoviridae*) (Jones 2003; Oliveira et al. 2001; Navas-Castillo et al. 2011) and these then cause yield losses, even with a low insect population. In addition, whitefly excretes honeydew on the leaf surface, which promotes its colonization by Ascomycete fungi, generally called “sooty mold”, which reduce photosynthesis efficiency (Byrne and Bellows Junior 1991; Perring et al. 2018). Whiteflies are particularly difficult to manage, due to their diversity, adaptability, rapid reproduction lifecycle, extensive host range, and the ability to quickly select populations resistant to insecticides, and also to transmit several viruses. Numerous management methods have been employed, such as biological control and agricultural practice strategies. However, the use of chemicals remains the common practice, which causes the development of insecticidal resistance. Consequently, there is considerable interest in the introduction of whitefly resistance into plants by classical and molecular breeding.

RNA interference (RNAi) has evolved as an important defense mechanism in eukaryotes against viruses and transposable elements (Obbard et al. 2009). In insects, RNAi have been reported in species from *Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Diptera*, *Hemiptera*, *Hymenoptera*, *Dictyoptera*, *Isoptera* and *Orthoptera* orders (Swevers and Smaghe 2012). Three RNAi pathways have been identified mediated by different small RNA molecules playing a role in defense against viruses and transposons (via siRNA), regulating gene expression (via miRNA) and suppression of germ-line transposon expression (via piRNA) (Yan et al. 2020).

Although some insect species are insensitive to RNAi through feeding, gene silencing is usually triggered by supplying exogenous dsRNA by topical applications, such as foliar spray, micro-injection, root dipping and seed treatment, and expression of dsRNA in transgenic plants (for a review see Yan et al. 2020). The effectiveness of RNAi as a tool to generate transgenic crops resistant to insect pests has been demonstrated (Baum et al. 2007; Mao et al. 2007; Gordon and Waterhouse 2007) and is now a reality with the development of some commercial products (Head et al. 2017).

RNAi-mediated gene silencing has been demonstrated in whiteflies. For example, silencing of genes (*Cyp315a1*, *Cyp18a1*, *EcR* and *E75*) from the ecdysone pathway through leaf-mediated dsRNA feeding assays had a limited effect on the survival and fecundity of adult whiteflies, while in nymphs, gene silencing reduced survival and delayed development (Luan et al. 2013). Raza et al. (2016) reported 70% insect mortality in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) engineered to express dsRNAs for silencing insect aquaporin and alpha glucosidase genes. Similarly, acetylcholinesterase (*AChE*) and ecdysone receptor (*EcR*) genes from whitefly were used to induce mortality of up to 90% in tobacco (Malik et al. 2016). Thakur et al. (2014) showed mortality of 34 to 85% among insects feeding on transgenic tobacco leaf discs expressing a v-ATPase gene target. Experiments to express a 370-bp fragment from the green fluorescent protein gene (dsGFP) in transgenic tomato plants revealed its partial non-specific degradation when ingested by the insects (Luo et al. 2017). However, most of the degradation of dsGFP was when it was orally co-administrated with dsRNA against insect dsRNases. In addition, the insect mortality reached 50% over 6 days on artificial diets stacking dsRNA against *B. tabaci* dsRNases, and two insect coding genes, aquaporin (AQP1) and sucrose (SUC1) (Luo et al. 2017). Recently, Xia et al. (2021) reported resistance in transgenic tomato plants modified to silence the *BtPMT1* gene by impairing whitefly ability to detoxicate plant phenolic glucosides.

We have previously shown mortality of 83–98% in adult whiteflies and 95% reduction in the number of eggs of whiteflies feeding on transgenic lettuce expressing dsRNA corresponding to a vATPase gene (Ibrahim et al.

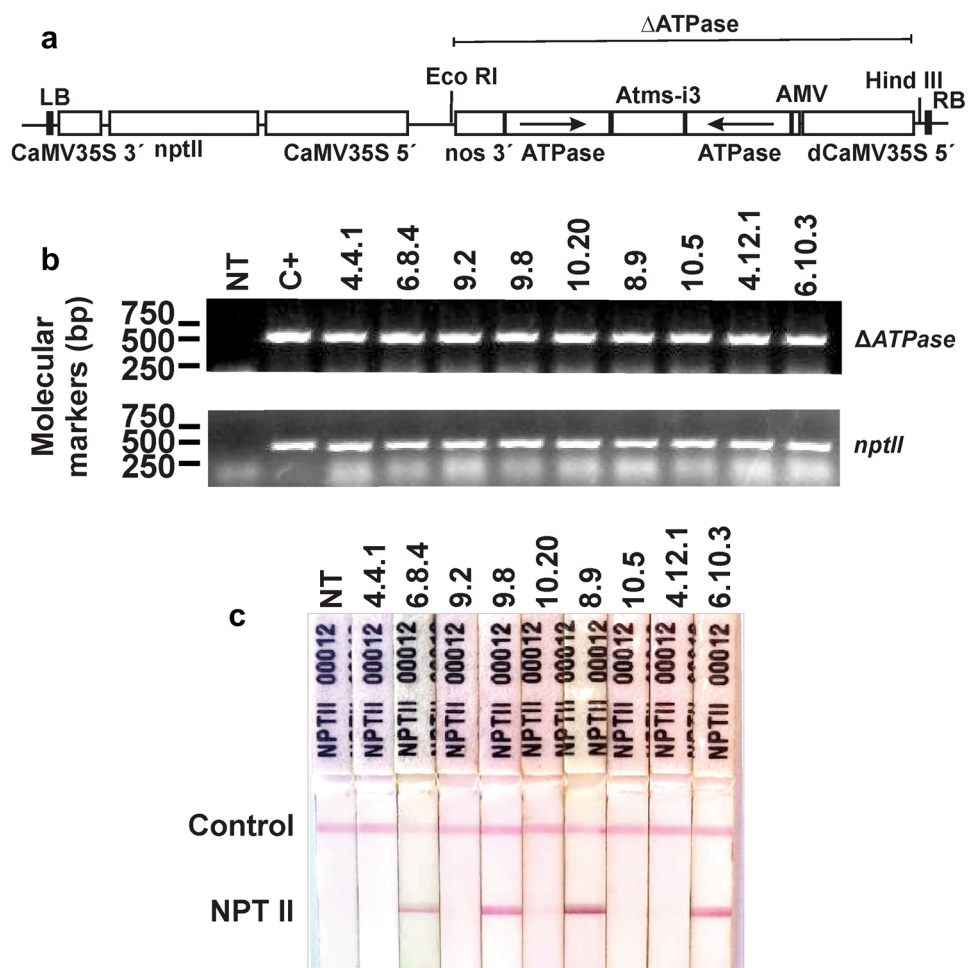
2017). Since transmembrane ATPases are crucial for several functions in the cell metabolism, intracellular membrane transport, and their processing, and transport of neurotransmitters, they seem to be promising candidates for engineering RNAi-based resistance to whiteflies in transgenic plants (Beyenbach and Wieczorek 2006; Upadhyay et al. 2011; Thakur et al. 2014; Ibrahim et al. 2017). However, since vATPase genes present some similarities among insect species, the effect of gene silencing on non-target organisms might be a constraint that should be investigated. Here we report the generation of transgenic tomato lines engineered to express dsRNA molecules targeting a *B. tabaci* vATPase gene. We hypothesized that the expression of this vATPase intron-hairpin construction would interfere in insect survival, generating tolerant tomato plants.

## Materials and methods

### RNAi construct

The RNAi cassette was cut from the vector pBtAT-PaseC3300 (Ibrahim et al. 2017) with Hind III and Eco RI and transferred to pCambia2300, generating pC2300ATPase (Fig. 1a), used to transform tomato. In addition, pC2300AT-Pase has the *nptII* gene that confers tolerance to kanamycin, used to select the transgenic plants. The interfering cassette containing the v-ATPase sequence hairpin will be referred to hereafter as  $\Delta$ ATPase (Fig. 1a). It is composed of a fragment of 545 bp from the *B. tabaci* vacuolar ATP synthase catalytic subunit A gene (Ibrahim et al. 2017) cloned in sense and antisense orientations into the vector pSIU (Tinoco et al. 2010), flanked by the intron 3 of the malate synthase gene from *Arabidopsis thaliana* (Atms-i3) and driven by a double 35 S *cauliflower mosaic virus* (35SCaMV) promoter plus a leader sequence from Alfalfa mosaic virus (AMV) (Datla et al. 1991).

**Fig. 1** Molecular analyses of transgenic lines. **a** Schematic representation of the T-DNA region of the pC2300ATPase vector containing the RNAi constructs for sequences specific to the whitefly vATPase gene ( $\Delta$ ATPase), and the *nptII* gene, which encodes for the enzyme NPTII (neomycin phosphotransferase II) and confers resistance to kanamycin. The backbone is from pCambia2300. **b** PCR analysis of 9 transformed lines for detection of the  $\Delta$ ATPase and *nptII* transgenes. C+ is the positive control (vector pC2300ATPase). **c** ImmunoStrip test of PCR-positive plants for detection of neomycin phosphotransferase II. NT are non-transgenic plants



## Tomato genetic transformation

Plant genetic transformation was carried out according to Sun et al. (2006) with modifications. Mature tomato seeds (cv. MicroTom) were surface disinfested at 70% ethanol for 1 min and 2% sodium hypochlorite for 5 min, followed by five rinses with autoclaved distilled water. Seeds were then dried out on filter paper and transferred to half-strength MS medium. Germination was carried out for a period of 6 days under dark conditions, followed by 2 to 4 days at 16 h-photoperiod at  $25\pm 2$  °C. Cotyledons from germinated seedlings were transversely cut in two halves, and the explants (distal and proximal) were immersed in an agrobacterial suspension for 30 min. Explants were dried out on filter paper and transferred to co-culture medium (MS medium salts, B5 medium vitamins, 200 mg/L PVP, 200 mg/L MES, 5  $\mu$ M BAP, 0.1  $\mu$ M IAA, 200  $\mu$ M acetosyringone, 400 mg/L cysteine, 3% sucrose, 0.6% agar, pH 5.2) with the abaxial surface facing downwards, for 48 h in the dark at  $25\pm 2$  °C. After two days, explants were transferred to MS medium supplemented with 200 mg/L PVP, 200 mg/L MES, 2 mg/L silver nitrate, 5  $\mu$ M zeatin, 0.1  $\mu$ M IAA, 2% sucrose, B5 medium vitamins, 100 mg/L Timentin, 200 mg/L cefotaxime, 50 mg/L kanamycin and 0.6% agar, pH 5.7. After 3 to 4 weeks, the concentration of kanamycin was reduced to 25 mg/L and the explants were sub-cultured every 15 days, until formation of plantlets. Emerging shoots were transferred to an elongation medium (MS medium salts supplemented with 3% sucrose, B5 medium vitamins, 100 mg/L Timentin, 200 mg/L cefotaxime, 25 mg/L kanamycin and 0.6% agar, pH 5.7). Well-developed and elongated shoots were transferred to a rooting medium (MS medium salts, B5 medium vitamins, 1 mg/L IBA, 100 mg/L Timentin, 200 mg/L cefotaxime, 25 mg/L kanamycin and 3% sucrose, 0.6% agar, pH 5.7). With the full development of the roots, plants were acclimated in a greenhouse and allowed to set seeds. Agrobacterial suspension was prepared cultivating *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 on solid AB medium (Chilton et al. 1974) containing 100 mg/L rifampicin and 100 mg/L kanamycin for 2 to 3 days at 28 °C. Then bacterial culture was suspended in liquid co-culture medium and diluted to  $OD_{600} = 0.5$ .

## Screening of transgenic plants

Regenerated plants were screened for the presence of the neomycin phosphotransferase II (NPTII) using the ImmunoStrip (Agdia, USA), according to the manufacturer's recommendations. DNA from leaves was isolated using a modified version of Doyle and Doyle (1987) and amplified by PCR analyses using the primer pairs ATPXS1 (TTC TAGAGCTCTATCACACTATCTGAGTAC) / ATPSK1 (GGTACCACTAGTGGGAAGTTTTTATCGTAG) for the detection of  $\Delta$ ATPase and NPTII 60 (GAGGCTATTCGG

CTATGACTG) / NPTII 470 (TCGACAAGACCGGCTTCC ATC) for the detection of the *nptII* gene. PCR was carried out according to Bonfim et al. (2007). The reaction was subjected to 95 °C (5 min) for denaturation, and amplified by 35 cycles (95 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, 72 °C for 2 min) with a final elongation cycle of 7 min at 72 °C.

## Progeny analysis

Seeds of the first generation ( $T_1$ ) of self-pollinated plants were germinated and analyzed for the presence of  $\Delta$ ATPase by PCR, as described. Pearson's Chi squared ( $X^2$ ) was used to determine whether the observed segregation ratio was consistent with a Mendelian ratio of 3:1, at 95% level of confidence. Yates's correction factor was used when one of the frequencies was less than 5, or when the total value of plants evaluated was less than 20.

## Analysis of siRNAs

Total RNA from tomato transgenic (in homozygosis) and non-transgenic lines was extracted with Trizol (Invitrogen) as recommended by the manufacturer. The siRNA analysis was carried out as described by Bonfim et al. (2007). Hybridization was performed using a DNA probe corresponding to the vATPase PCR fragment amplified using the primer pair ATPXS1/ATPSK1 labeled with  $\alpha^{32}P$  dCTP and the DecaLabel DNA Labeling Kit (Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. Hybridization and post-hybridization washes were conducted as described by Yoo et al. (2004). Oligomers (18, 25 and 39 nucleotides) were used as molecular size markers. The bands were visualized with a fluorescent image analyzer (FLA-3000; Fujifilm).

## Whitefly mortality, development and preference assays

*Bemisia tabaci* colonies have been maintained in common beans in a screenhouse at Embrapa Arroz e Feijão, in Santo Antonio de Goias, Goias state, Central Brazil, for over ten years. Care has been taken to avoid inbreeding depression by introducing new specimens regularly into the colony. The whitefly population in our colony was identified as *B. tabaci* MEAM1 (=biotype B) and it has been monitored by sequencing the mitochondrial cytochrome oxidase I (mtCOI) gene.

Whitefly mortality was evaluated on 4-week-old plants from the following transgenic tomato lines: 4.4.1, 6.8.4, 9.2 and control (non-transgenic plants). Three plants of each line were submitted to whitefly oviposition for 2 h. After that, the adult whiteflies were removed and plants were isolated in individual cages (68 cm x 27 cm x 27 cm) in the greenhouse.

Insects developed from eggs into adults, and adult mortality was registered after 5 to 7 days. Plants were placed over a black plastic canvas, so dead insects were easily found inside the cage. On the seventh day, the number of living and dead insects was counted, as the insects were removed from the cages using an insect aspirator. Then, the number of empty pupa cases on the leaves was counted under stereomicroscope. To calculate the percentage of mortality, the number of empty pupa cases was used as the total number of adult insects in each replicate. This experiment was repeated twice.

Insect development from egg to adult was evaluated on 10 individual eggs per plant on tomato line 4.4.1 and the control (non-transgenic plants), with 5–8 replicates. For that, 4-week-old plants were exposed to whitefly oviposition for 1 h, the adults were removed. When the 1st instar nymphs became sessile, their spots on the leaf were circled and numbered using a permanent marker, taking care not to damage the plant or the insect. Plants were maintained at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , with 70–80% relative humidity and 16 h/8 h light/dark conditions. The nymphal stage of each individual was recorded daily, until adult emergence, using a stereomicroscope. Mortality in each stage was also recorded.

A free-choice experiment was carried out to evaluate preference and attraction of adult whiteflies to the transgenic tomato lines. For that, 4-week-old plants of the line 4.4.1 and control plants (10 replicates per treatment) were intercalated in a circle, in a whitefly-free screenhouse and then, 300 adult insects were released in the center of the circle. After 48 h, the number of adults in each plant was counted, by carefully looking at the leaves. After five days, the number of eggs per plant was counted using a stereomicroscope.

### Quantitative real-time PCR

The transcription level of the endogenous  $\nu$ -ATPase gene in *B. tabaci* interacting with transgenic line 4.4.1 and non-transgenic tomato leaves was determined by quantitative reverse transcription. RNA isolation and RT-qPCR were performed as described by Andrade et al. (2016). Whiteflies were released into bioassay systems containing tomato plants as described above for the whitefly mortality assays. After 48 h, total RNA was extracted from 150 surviving insects per replicate, of which 200 ng from each of the samples was used to synthesize cDNA using Promega GoScript Reverse Transcription System (Promega) as recommended by the manufacturer. Reactions were performed using the StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) with SYBR-green detection. The primers for the endogenous  $\nu$ ATPase (GGTGGAGACTTGTACGGTATTG and TGACAGTACCTTTGGCTTTAGG) and actin (GAC CAGCCAAGTCCAAACGA and CCTTTGTGGTAGAGG TCTCAGTT) genes were designed using the PrimerQuest

Tool (IDT Integrated DNA Technologies, Inc.). The relative  $\nu$ ATPase transcription levels in different RNA samples were normalized with respect to the internal standard actin gene. Triplicate quantitative assays were performed from three biological samples. The relative level of the expression was calculated using the Livak method (Livak and Schmittgen 2001).

### Effect on non-target organisms

In order to determine whether the transgenic tomato plants present negative effects on non-target insects that interact with tomato plants, two assays were carried out: the first one with *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphidae), which has the same feeding habit as the whitefly, and the second with *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae).

*M. persicae* fourth instar nymphs were transferred to tomato plants (50 insects per plant), and aphid numbers were counted after seven days of feeding. Plants were maintained at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , with 70–90% relative humidity, under greenhouse conditions without additional illumination. Six transgenic and non-transgenic plants were used. *M. persicae* were collected from naturally occurring colonies on weed plants, and kept on tomato plants until used for these experiments.

*Tuta absoluta* (three L1 to L3 instar caterpillars per leaf) were transferred to five leaves detached from transgenic and non-transgenic tomato plants maintained in two-compartment Petri dishes. After 27 days, the number of emerging adults was recorded, expressed as the percentage of normal adults related to the total number of caterpillars. Insect colonies were obtained from tomato plants cultivated under greenhouse conditions at Embrapa Hortaliças (Brasília, DF).

### Statistical analysis

The experiments were carried out in a completely randomized design. Data were analyzed by one-way ANOVA. Percentage data were transformed by arcsine square root before analysis. Levene's test was applied to check for the homogeneity of variance. Mean comparisons were performed by Dunnett's test, as implemented in GraphPad Prism 6.0 software. Mortality of *B. tabaci* nymphs developed on the tomato transgenic line was compared to the control line using a chi-square test ( $p < 0.05$ ), for each nymphal stage. The Shapiro-Wilk normality test was conducted to test for the normality of data and when data was not in a normal distribution, a non-parametric Wilcoxon rank sum test with continuity correction was applied for mean comparisons. The mean number of adults sitting on the plants and eggs laid, in the attraction and preference assays with *B. tabaci*, was compared between treatments using the t test ( $p < 0.05$ ).



## Results

To determine the effectiveness of siRNA to produce tomato plants tolerant to whitefly by silencing vATPase, nine independent transgenic lines were generated with the pC2300AT-Pase vector, containing the intron-spliced hpRNA interfering cassette ( $\Delta$ ATPase) (Fig. 1a). PCR analyses revealed the presence of both  $\Delta$ ATPase and *nptIII* transgenes in all transgenic lines (Fig. 1b). Progenies were analyzed for the presence of the neomycin phosphotransferase II protein (NPT II) using the immunochromatographic method (Fig. 1c). A strong signal was observed in lines 6.8.4, 6.10.3, 9.8 and 8.9. However, lines 10.20 and 4.12.1 presented a weak signal, while no NPT II band was observed for lines 4.4, 9.2, 10.5 and non-transgenic plants (control) (Fig. 1c).

Except for the line 6.10.3, primary transformants ( $T_0$ ) were cultivated in the greenhouse and presented normal phenology and phenotype (plant height, number of leaves, number of branches and number of flowers and fruits). Line 6.10.3 presented several fruits without seeds and a significantly lower number of seeds per fruit (average of 1.3 seeds/fruit) when compared to the other transgenic lines and control plants (average of 27.9 seeds/fruit). Line 6.10.3 was not used for further studies.

Based on the PCR analyses, the chi-squared test revealed that both  $\Delta$ ATPase and *nptIII* transgenes co-segregated in the  $T_1$  generation (self-pollinated), closely fitting the Mendelian ratio of 3:1, as expected for one integration locus (Table 1).

Northern analyses were carried out to detect the  $\Delta$ ATPase siRNA in leaves from phenotypically normal lines of transgenic and non-transgenic tomato. Results revealed the presence of siRNA bands of expected size range for transgenic lines 4.4.1, 6.8.4, 9.2, 10.20, 8.9, 10.5, and 4.12.1. Lines 4.4.1, 6.8.4 and 9.2, which presented strong, intermediate

and weak signals, respectively (Fig. 2), were used for the mortality assays. No signal was observed in non-transgenic plants. No direct correlation was observed between *nptIII* gene expression (Fig. 1c) and  $\Delta$ ATPase expression (amounts of siRNA) (Fig. 2).

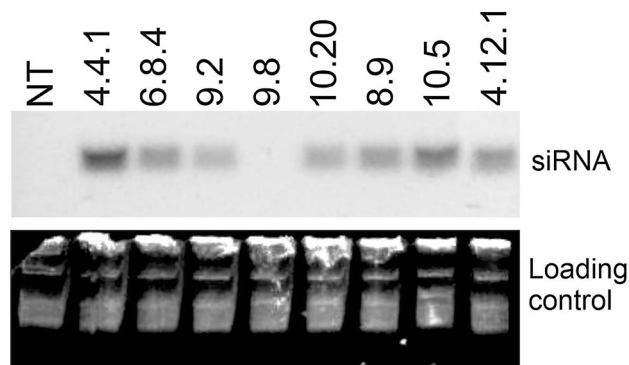
Line 4.4.1, which presented higher siRNA amounts in the Northern analyses, was chosen for the whitefly feeding experiments. Lines 6.8.4 and 9.2, which presented weaker signals, were also chosen as an attempt to establish the cause-effect relationship between insect tolerance and amounts of siRNA produced by the host. Tomato plants were challenged with newly emerged adult whiteflies and their mortality recorded after five to seven days (Fig. 3a). The results revealed that whiteflies that were fed on the transgenic line 4.4.1 presented statistically significant higher mortality rate (57.1%), when compared to insects fed on lines 6.8.4 (23.5% mortality), 9.2 (27.5% mortality), and non-transgenic control (7.6% mortality) plants ( $P < 0.05$ ) (Fig. 3a). Quantitative real-time PCR was carried out to quantify the transcription level of the endogenous v-ATPase gene in *B. tabaci* feeding on the transgenic tomato leaves from line 4.4.1. The results showed that vATPase expression was significantly lower (by 50.2%;  $P < 0.05$ ) in insects interacting with the transgenic plants, when compared to the level observed in insects interacting with non-transgenic plants (Fig. 3b). Insect developmental time on tomato line 4.4.1 was similar to that on the non-transgenic control plants, except for the 3rd instar, which was significantly longer on the transgenic plant ( $P < 0.05$ ) (Fig. 3c), suggesting a slight delay in their nymphal stage development. Insect mortality was significantly higher on the transgenic line 4.4.1 than on the control plants only for the 2nd instar (Table 2). In the preference assay, the number of adult insects per plant did not differ between treatments. However, the number of eggs per plant was significantly lower in the transgenic plants (Table 3).

**Table 1** Segregation analysis of self-pollinated transgenic plants in the  $T_1$  generation

Lines	Positive <sup>a</sup>	Negative	$\chi^2$	P <sup>b</sup>
4.4.1	15	5	0.00	1
6.8.4	16	4	0.47	0.61
9.2	7	2	0.26	0.85
9.8	7	5	1.44	0.18
10.20	14	8	1.52	0.22
8.9	23	11	0.98	0.32
10.5	7	5	1.44	0.18
4.12.1	15	4	0.34	0.69
6.10.3	12	2	1.23	0.35

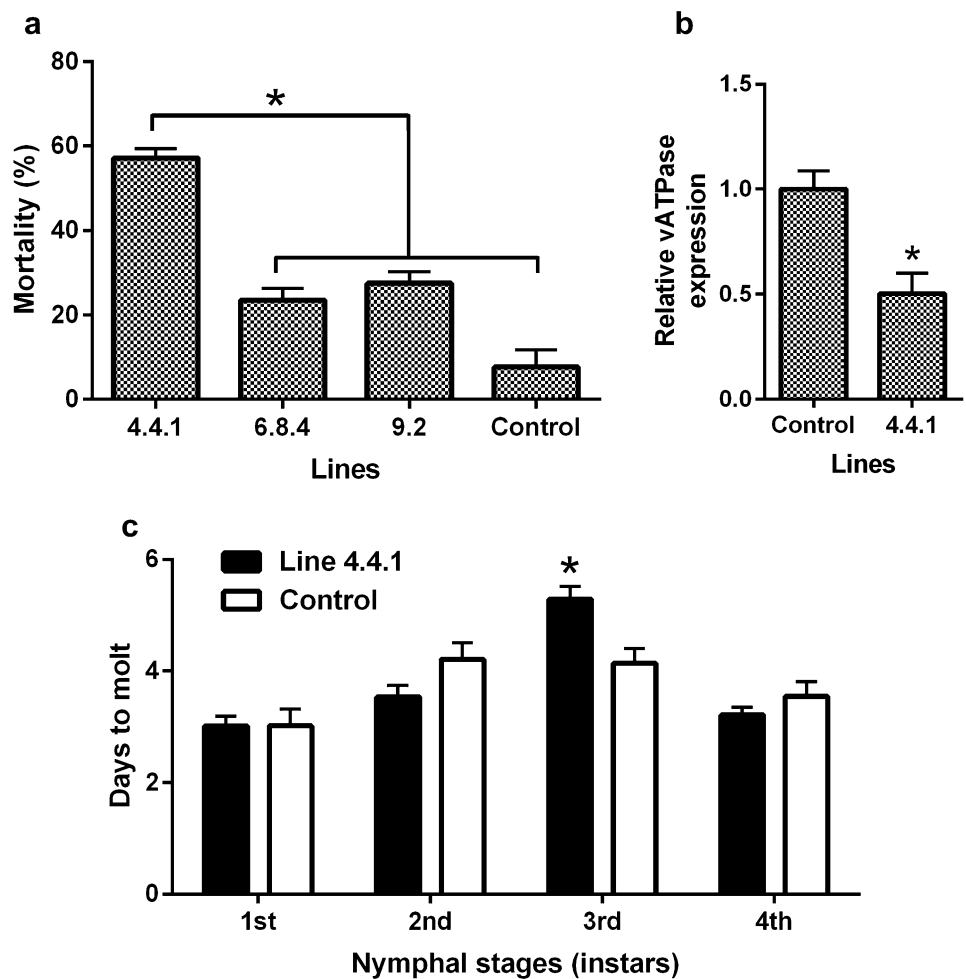
<sup>a</sup>Data are based on PCR analyses for the  $\Delta$ ATPase and *nptIII* transgenes

<sup>b</sup>P is the probability that the observed ratios reflect the segregation ratio of 3:1



**Fig. 2** Northern blot analysis for detection of the small interfering vATPase siRNA isolated from transgenic tomato lines. SYBR Safe-stained RNA serves as loading control. NT non-transgenic line

**Fig. 3** Bioassays using transgenic tomato lines compared to non-transgenic for feeding *B. tabaci*. **a** Average mortality of *B. tabaci* feeding on transgenic tomato lines for a period of 7 days (\* $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ). **b** Relative expression of v-ATPase in insects feeding on transgenic tomato line 4.4.1 for 48 h, determined by quantitative real-time RT-PCR. Data represent means of three replications (\* $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ). **c** Developmental time of *B. tabaci* nymphal stages on the tomato line 4.4.1, compared to the non-transgenic control line (\* $p < 0.05$ ,  $n = 50–80$ ). Bars represent  $\pm$  standard errors



**Table 2** Insect mortality by nymphal stage on tomato line 4.4.1, compared to the control tomato plants

Tomato line/Nymphal stage	Number of dead nymphs / total number of nymphs (% mortality)			
	1st instar	2nd instar	3rd instar	4th instar
4.4.1	2/90 (2.2%)	15/90 (16.7%)	3/90 (3.3%)	1/90 (1.1%)
Control	3/38 (7.9%)	0/38 (0%)	3/38 (7.9%)	0/38 (0%)
Chi-square analysis ( $p < 0.05$ )	N.S.	* $p = 0.00739$	N.S.	N.S.

\* Significantly different ( $p < 0.05$ )  
 N.S. Non-significant

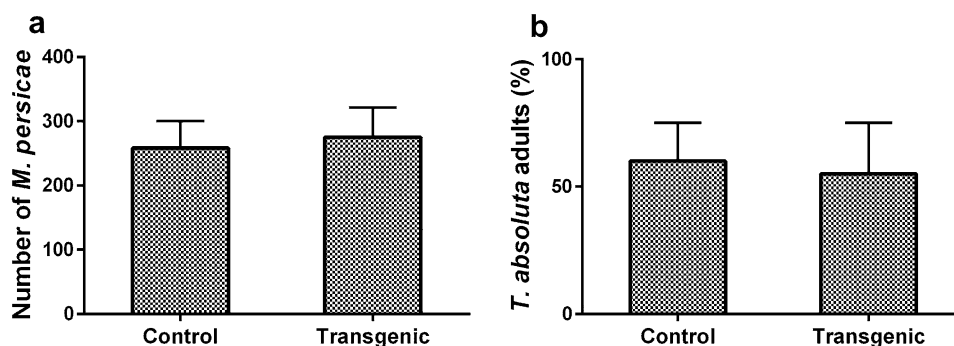
**Table 3** Attraction and oviposition preference of adult whiteflies on tomato lines in a free-choice experiment, expressed as the number of adult whiteflies sitting on tomato lines and the number of eggs laid on the plants after 48 h

Average number of adult insects or eggs per plant ( $\pm$ st error)	Tomato line	
	4.4.1	Control
Adults	2 ( $\pm 0.8$ )	3.9 ( $\pm 1.4$ )
Eggs	22.75 ( $\pm 11.4$ )*	154.5 ( $\pm 61.8$ )

\*Means are significantly different ( $n = 10$ ,  $p < 0.05$ )

Due to the similarities in vATPase gene sequences among insects, two insect species [*M. persicae* (Hemiptera: Aphidae) and *T. absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae)], which closely interact with tomato leaves, were chosen for a non-target assay. Results showed no difference in the progeny number of *M. persicae* and percentage of emerging adults of *T. absoluta* after feeding on transgenic line 4.4.1 (Fig. 4), as compared to the insects that fed on the non-transgenic plants. The results suggest that the siRNA produced by the expression of the  $\Delta$ ATPase transgene did not significantly

**Fig. 4** Non-target assays using transgenic tomato plants to feed *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphidae) or *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **a** Progeny average of 50 *M. persicae* adults per replicate (plants of line 4.4.1). **b** Percentage of emerging adults of *T. absoluta* on detached leaves of transgenic line 4.4.1 (\* $p < 0.05$ ,  $n=5$ )



impair the expression of endogenous ATPase coding genes in *M. persicae* and *T. absoluta*.

## Discussion

Whiteflies are among the most important insect pests that impair the production of vegetable crops worldwide, especially in tropical regions, where their control is even more challenging. In high-incidence regions, their control is essentially based on the use of insecticides, with partial efficacy, negative environmental effects, reduction of abundance and diversity of natural enemies, and selection of pesticide-resistant whitefly populations. Thus, the best way to manage this pest in the field is to develop plant genetic resistance or tolerance. The concept of using RNA interference (RNAi) constructs to silence key genes in insect pests promotes the development of novel approaches toward plant protection in a sustainable way (Yan et al. 2020).

Several target genes have been proposed for engineering insect resistance in plants using plant-mediated RNAi strategies. vATPase coding genes are among the most promising targets for gene silencing, which has been applied to some model plants and commercial crops (Yan et al. 2020; Liu et al. 2020; Ibrahim et al. 2017). In the present study, we showed that the expression of siRNA corresponding to sequences of a vATPase gene from *B. tabaci* conferred tolerance to this insect pest in genetically modified tomato. In addition, a significant reduction in endogenous gene expression was observed, revealed by RT-qPCR analysis, associated with 57% mortality in adult insects. Previously, we had expressed vATPase siRNA in lettuce plants and observed whitefly adult mortality between 83.8 and 98.1% within 5 days of feeding on transgenic plants (Ibrahim et al. 2017). Although the percentage of insect mortality was lower, our present results with this tomato line suggest a reasonable level of tolerance to the target insect pest, which might represent a promising tool to be used along with other management strategies. Baum et al. (2007) demonstrated that vATPase dsRNA supplied in an artificial diet, and expressed in transgenic maize, triggered RNA interference in *Diabrotica*

*virgifera*, resulting in larval stunting and mortality. Thakur et al. (2014) reported a 34 to 85% mortality among whiteflies feeding on leaf discs from transgenic tobacco expressing siRNA from a v-ATPase. Our results showed higher mortality of 2nd instar nymphs and a slight delay in the development of 3rd instar nymphs feeding on the tomato line 4.4.1, suggesting that the development of 2nd and 3rd instars was impaired by the transgenic line. Additionally, although the attraction of insects was not significantly different between treatments, the number of eggs laid by the insects on the transgenic plants was significantly lower, corroborating the results obtained with the lettuce transgenic plants carrying the same RNAi construct as we used in the present work (Ibrahim et al. 2017). In phloem feeders, host plant selection starts with olfactory cues, meaning that the insects assess the suitability of a host plant mainly by the plant volatiles (Powell et al. 2006). Our data shows that the number of adults settling on the transgenic plants did not differ from the conventional control plants, suggesting that the volatiles produced by both plants might be similar. However, other works have shown that even when the attraction of adults does not change among different treatments, a reduction in the oviposition might occur (Jiao et al. 2012; Li et al. 2017), suggesting that attraction of adults and preference for oviposition are not necessarily correlated. The host plant selection for oviposition by insects might be affected by differences in nutritional and defensive chemistry (Bernays and Chapman, 1994), such as the amount of wax on the leaves, presence of trichomes and glucosinolate, salicylic acid accumulation or the contents of nitrogen, carbohydrate, and phenolic compounds or chlorophyll, for example (Oriani and Vendramim, 2010; Jiao et al. 2012; Moshitzky and Morin, 2014; Ueda et al. 2019; Jafarbeigi et al. 2020; Abbasi et al. 2020). Moreover, treating plants with chemicals, such as essential oils, amino acids or insecticides, for example, can potentially reduce the preference of whiteflies for oviposition (Prabhaker et al. 1999; Hammad et al. 2001; Baldin et al. 2007; Yang et al. 2010), suggesting that oviposition might be reduced when the females perceive a potential hazard to the progeny (Moshitzky and Morin, 2014), or in other words, oviposition preference correlates with host suitability

for their offspring performance (preference–performance hypothesis) (Jaenike, 1978). Therefore, several factors might lead to a reduction in insect oviposition, and so we cannot rule out the potential effect of silencing a gene involved in many cellular processes, as the *vATPase*. Further research will be conducted in the future to investigate this hypothesis.

Luo et al. (2017) have shown that transgenic tomato plants engineered to express a dsRNA 370-bp fragment from the green fluorescent protein gene (*dsGFP*) was partially degraded when ingested by *B. tabaci*. In addition, they demonstrated that most of the *dsGFP* degradation was suppressed when it was orally co-administrated with dsRNA targeting insect dsRNases. Although the co-suppression of insect RNases genes could prevent the degradation of dsRNA for target genes, high levels of silencing could be achieved by higher expression levels of the intron-hairpin constructs (Luan et al. 2013, Thakur et al. 2014, Raza et al. 2016, Malik et al. 2016, Ibrahim et al. 2017 and Xia et al. 2021).

Since *vATPase* sequences share up to 83% nucleotide-sequence identities among insect pest and beneficial insect genomes, negative effects on the life cycle of non-target insect species may occur (Lundgren and Duan 2013). It may not be a problem in pest management (Yan et al. 2020) but it could affect the commercial approval of genetically modified crops. We tested transgenic tomatoes against two non-target insects, *M. persicae* and *T. absoluta*, which closely interact with tomato leaves. Despite similarities in the *vATPase* gene sequences of 83% and 85% for *M. persicae* and *T. absoluta*, respectively, we observed no negative effect on insect reproduction, survival and development. However, although the draft genome assembly of *T. absoluta* (Tabuloc et al. 2019) is available, only a few incomplete *ATPase* sequences are currently available in the NCBI GenBank. *In silico* comparison with *M. persicae* using the si-Fi Software (Lück et al. 2019) revealed just a few putative sequences presenting potential similarity for an unexpected gene silencing effect on this non-target insect species. Nevertheless, biosafety studies should be further carried out under field conditions to determine the effect of this tomato transgenic line on a greater number of insect species.

Although a correlation between siRNA amounts found in tomato leaves and tolerance has been established, no correlation was observed between the expression of the *nptII* selective gene and the  $\Delta$ *ATPase* transgenes. Similarly, in the transgenic common bean engineered to express dsRNA targeting the *rep* gene from Bean golden mosaic virus, no correlation was found between the amount of *rep* siRNA and the *ahas* gene expression, used for selection of transformed plants (Aragão et al. 2013).

RNAi efficiency is dependent on the siRNA (or dsRNA) dose (Vogel et al. 2019). In this study, the double 35 S CaMV promoter was used to control  $\Delta$ *ATPase*. Better

promoters might be identified to promote higher levels of transcription and consequently greater amounts of dsRNA into tomato leaves.

Collectively, the results presented here demonstrated the generation of whitefly-tolerant tomato plants mediated by the RNAi strategy. A correlation between the amount of siRNA *vATPase* and the insect tolerance was observed for the transgenic line 4.4.1. RT-qPCR analysis established the cause-effect relationship between silencing of the endogenous *BtvATPase* gene and adult mortality. Results presented here may form the foundation for the generation of elite tomato varieties resistant to whitefly, a devastating insect pest for horticultural crops.

**Acknowledgements** We would like to thank Dr. Miguel Michereff Filho (Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, Brazil) for providing the *T. absoluta* and Dr. Josias C. Faria (Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, Brazil) for providing the whitefly colony. This research was partially supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil, Grant Number 429161/2018-2).

**Author contribution** Investigation [CSRP, WRR, MCM, ALF, PVP, GBC]; Methodology [CSRP, WRR, MCM, FJLA]; Formal analysis [CSRP, PVP, FJLA]; Writing- Reviewing & Editing [CSRP, PVP, GBC, FJLA]; Conceptualization [FJLA]; Funding acquisition [FJLA], Supervision [FJLA]. All of the authors read and approved the final manuscript.

**Funding** Funding was provided by Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

**Data availability** The data generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors report no declarations of interest.

## References

- Abbasi A, Sufyan M, Arif MJ, Sahi TS (2020) Effect of silicon on oviposition preference and biology of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) feeding on *Gossypium hirsutum* (Linnaeus). *Int J Pest Manag*. <https://doi.org/10.1080/09670874.2020.1802084>
- Andrade CM, Tinoco MLP, Rieth AF, Maia FCO, Aragão FJL (2016) Host-induced gene silencing in the necrotrophic fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathol* 65(4):626–632. <https://doi.org/10.1111/ppa.12447>
- Aragão FJL, Nogueira EOPL, Tinoco MLP, Faria JC (2013) Molecular characterization of the first commercial transgenic common bean immune to the *Bean golden mosaic virus*. *J Biotechnol* 166(1–2):42–50. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.04.009>
- Baldin ELL, Vendramim JD, Lourenção AL (2007) Interaction between resistant tomato genotypes and plant extracts on *Bemisia tabaci*

- (Genn.) biotype B. *Sci. agric. (Piracicaba, Braz)* 64(5):476–481. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162007000500004>
- Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan O, Johnson S, Plaetinck G, Munyikwa T, Pleau M, Vaughn T, Roberts J (2007) Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat Biotechnol* 25:1322–1326. <https://doi.org/10.1038/nbt1359>
- Bernays EA, Chapman RE (eds) (1994) Chemicals in Plants. In: *Host-Plant Selection by Phytophagous Insects*. Springer US, Boston, pp 14–60
- Beyenbach KW, Wiczorek H (2006) The V-type H<sup>+</sup> ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J Exp Biol* 209:577–589. <https://doi.org/10.1242/jeb.02014>
- Bonfim K, Faria JC, Nogueira EOPL, Mendes EA, Aragão FJL (2007) RNAi-mediated resistance to *Bean golden mosaic virus* in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Mol Plant-Microbe Interact* 20(6):717–726. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-6-0717>
- Byrne DN, Bellows Junior TS (1991) Whitefly biology. *Annu Rev Entomol* 36:431–457. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.36.010191.002243>
- Chilton MD, Currier TC, Farrand SK, Bendich AJ, Gordon MP, Nester EW (1974) *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 71(9):3672–3676. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.9.3672>
- Datla RS, Hammerlindl JK, Pelcher LE, Crosby WL, Selvaraj G (1991) A bifunctional fusion between beta-glucuronidase and neomycin phosphotransferase: a broad-spectrum marker enzyme for plants. *Gene* 101(2):239–246. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90417-a](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90417-a)
- Dorais M, Ehret DL, Papadopoulos AP (2008) Tomato (*Solanum lycopersicum*) health components: from the seed to the consumer. *Phytochem Rev* 7:231–250. <https://doi.org/10.1007/s11101-007-9085-x>
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bull* 19:11–15
- Gordon KHI, Waterhouse PM (2007) RNAi for insect-proof plants. *Nat Biotechnol* 25(11):1231–1232. <https://doi.org/10.1038/nbt1107-1231>
- Greathead AH (1986) Host plants. In: Cock MJW (ed) *Bemisia tabaci*. A Literature Survey on the Cotton Whitefly with an Annotated Bibliography. C.A.B International Institute of Biological Control, Silwood Park, pp 17–26
- Hammad EMA-F, Zournajian H, Talhouk S (2001) Efficacy of extracts of *Melia azedarach* L. callus, leaves and fruits against adults of the sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* (Hom. Aleyrodidae) *J Appl Entomol* 125(8):483–488. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0418.2001.00577.x>
- Head GP, Carroll MW, Evans SP, Rule DM, Willse AR, Clark TL, Storer NP, Flannagan RD, Samuel LW, Meinke LJ (2017) Evaluation of SmartStax and SmartStax PRO maize against western corn rootworm and northern corn rootworm: efficacy and resistance management. *Pest Manage Sci* 73(9):1883–1899. <https://doi.org/10.1002/ps.4554>
- Ibrahim AB, Monteiro TR, Cabral GB, Aragão FJL (2017) RNAi-mediated resistance to whitefly (*Bemisia tabaci*) in genetically engineered lettuce (*Lactuca sativa*). *Transgenic Res* 26(5):613–624. <https://doi.org/10.1007/s11248-017-0035-0>
- Jaenike J (1978) On optimal oviposition behavior in phytophagous insects. *Theor Popul Biol* 14(3):350–356. [https://doi.org/10.1016/0040-5809\(78\)90012-6](https://doi.org/10.1016/0040-5809(78)90012-6)
- Jafarbeigi F, Samih MA, Alaei H, Shirani H (2020) Induced tomato resistance against *Bemisia tabaci* triggered by salicylic acid,  $\beta$ -aminobutyric acid, and trichoderma. *Neotrop Entomol* 49(3):456–467. <https://doi.org/10.1007/s13744-020-00771-0>
- Jiao X, Xie W, Wang S, Wu Q, Zhou L, Pan H, Liu B, Zhang Y (2012) Host preference and nymph performance of B and Q putative species of *Bemisia tabaci* on three host plants. *J Pest Sci* 85:423–430. <https://doi.org/10.1007/s10340-012-0441-2>
- Jones DR (2003) Plant viruses transmitted by whiteflies. *Eur J Plant Pathol* 109(3):195–219. <https://doi.org/10.1023/A:1022846630513>
- Li J, Rao L, Xie H, Schreiner M, Chen L, Liu Y (2017) Morphology and glucosinolate profiles of chimeric *Brassica* and the responses of *Bemisia tabaci* in host selection, oviposition and development. *J Integr Agric* 16(9):2009–2018. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61617-9](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61617-9)
- Liu S, Jauannet M, Dempsey D'MA, Imani J, Coustau C, Kogel K-H (2020) RNA-based technologies for insect control in plant production. *Biotechnol Adv* 39:107463. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107463>
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)). *Methods* 25(4):402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Luan J-B, Ghanim M, Liu S-S, Czosnek H (2013) Silencing the ecdysone synthesis and signaling pathway genes disrupts nymphal development in the whitefly. *Insect Biochem Mol Biol* 43(8):740–746. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.05.012>
- Lück S, Kreszies T, Strickert M, Schweizer P, Kuhlmann M, Douchkov D (2019) siRNA-Finder (si-Fi) Software for RNAi-Target Design and Off-Target Prediction. *Front Plant Sci* 10:1023. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01023>
- Lundgren JG, Duan JJ (2013) RNAi-based insecticidal crops: potential effects on nontarget species. *Bioscience* 63(8):657–665. <https://doi.org/10.1525/bio.2013.63.8.8>
- Luo Y, Chen Q, Luan J, Chung SH, Eck JV, Turgeon R, Douglas AE (2017) Towards an understanding of the molecular basis of effective RNAi against a global insect pest, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Insect Biochem Mol Biol* 88:21e29. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.07.005>
- Malik HI, Raza A, Amin I, Scheffler JA, Scheffler BE, Brown JK, Mansoor S (2016) RNAi-mediated mortality of the whitefly through transgenic expression of double-stranded RNA homologous to acetylcholinesterase and ecdysone receptor in tobacco plants. *Sci Rep* 6(1):38469. <https://doi.org/10.1038/srep38469>
- Mao YB, Cai WJ, Wang JW, Hong GJ, Tao XY, Wang LJ, Huang YP, Chen XY (2007) Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nat Biotechnol* 25(11):1307–1313. <https://doi.org/10.1038/nbt1352>
- Moshitzky P, Morin S (2014) *Bemisia tabaci* females from the Mediterranean (Q) species detect and avoid laying eggs in the presence of pyriproxyfen, a juvenile hormone analogue. *Pest Manage Sci* 70(10):1468–1476. <https://doi.org/10.1002/ps.3698>
- Navas-Castillo J, Fiallo-Olivé E, Sánchez-Campos S (2011) Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annu Rev Phytopathol* 49(15):219–248. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095235>
- Obbard DJ, Gordon KHI, Buck AH, Jiggins FM (2009) The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364(1513):99–115. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0168>
- Oliveira MRV, Henneberry TJ, Anderson P (2001) History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. *Crop Prot* 20(9):709–723. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(01\)00108-9](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(01)00108-9)
- Oriani MA, de G, Vendramim JD, (2010) Influence of trichomes on attractiveness and ovipositional preference of *Bemisia tabaci* (Genn) B biotype (Hemiptera: Aleyrodidae) on tomato genotypes.

- Neotrop Entomol 39(6):1002–1007. <https://doi.org/10.1590/S1519-566-2010000600024>
- Perring TM, Stansly PA, Liu TX, Smith HA, Andreason SA (2018) Whiteflies: Biology, Ecology, and Management. In: Wakil W, Brust GE, Perring TM Sustainable Management of Arthropod Pests of Tomato. Academic Press - Elsevier Science 372: 73–110 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802441-6.00004-8>.
- Powell G, Tosh CR, Hardie J (2006) Host plant selection by aphids: Behavioral, evolutionary, and applied perspectives. Annu Rev Entomol 51:309–330. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151107>
- Prabhaker N, Toscano NC, Henneberry TJ (1999) Comparison of neem, urea, and amitraz as oviposition suppressants and larvicides against *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae). J Econ Entomol 92(1):40–46. <https://doi.org/10.1093/jee/92.1.40>
- Raza A, Malik HJ, Shafiq M, Amin I, Scheffler JA, Scheffler BE, Mansoor S (2016) RNA Interference based Approach to Down Regulate Osmoregulators of Whitefly (*Bemisia tabaci*): Potential Technology for the Control of Whitefly. PLoS One 11(4):e0153883. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153883>
- Shah MMR, Liu TX (2013) Feeding Experience of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) Affects Their Performance on Different Host Plants. PLoS One 8(10):e77368. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077368>
- Sun HJ, Uchii S, Watanabe S, Ezura H (2006) A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. Plant Cell Physiol 47(3):426–431. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci251>
- Swevers L, Smaghe G (2012) Use of RNAi for control of insect crop pests. In: Smaghe G, Diaz I (eds) Arthropod-plant interactions: novel insights and approaches for IPM, Progress in Biological Control 14, Netherlands, pp 177–197. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-3873-77>
- Tabuloc CA, Lewald KM, Conner WR, Lee Y, Lee EK, Cain AB, Godfrey KE, Arnó J, Agustí N, Perini CR, Guedes JC, Zalom FG, Chiu JC (2019) Sequencing of *Tuta absoluta* genome to develop SNP genotyping assays for species identification. J Pest Sci 92:1397–1407. <https://doi.org/10.1007/s10340-019-01116-6>
- Thakur N, Upadhyay SK, Verma PC, Chandrashekar K, Tuli R, Singh PK (2014) Enhanced whitefly resistance in transgenic tobacco plants expressing double stranded RNA of *v-ATPase A* gene. PLoS One 9(3):e87235. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087235>
- Tinoco MLP, Dias BBA, Dall’Astia RC, Pamphile JA, Aragão FJL (2010) *In vivo* trans-specific gene silencing in fungal cells by *in planta* expression of a double-stranded RNA. BMC Biol 8(27):27. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-27>
- Ueda H, Kugimiya S, Tabata J, Kitamoto H, Mitsuahara I (2019) Accumulation of salicylic acid in tomato plant under biological stress affects oviposition preference of *Bemisia tabaci*. J Plant Interact 14(1):73–78. <https://doi.org/10.1080/17429145.2018.1550220>
- Upadhyay SK, Chandrashekar K, Thakur N, Verma PC, Borgio JF, Singh PK, Tuli R (2011) RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route. J Biosci 36(1):153–161. <https://doi.org/10.1007/s12038-011-9009-1>
- Vogel E, Santos D, Mingels L, Verdonck T-W, Broeck JV (2019) RNA Interference in Insects: Protecting Beneficials and Controlling Pests. Front Physiol 9:1912. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01912>
- Xia J, Guo Z, Yang Z, Han H, Wang S, Xu H, Yang F, Wu Q, Xie W, Zhou X, Dermauw W, Turlings TCJ, Zhang Y (2021) Whitefly hijacks a plant detoxification gene that neutralizes plant toxins. Cell 184:1–13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.014>
- Yan S, Ren B, Zeng B, Shen J (2020) Improving RNAi efficiency for pest control in crop species. Biotechniques 68(5):283–290. <https://doi.org/10.2144/btn-2019-0171>
- Yang N-W, Li A-L, Wan F-H, Liu W-X, Johnson D (2010) Effects of plant essential oils on immature and adult sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* biotype B. Crop Prot 29(10):1200–1207. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.05.006>
- Yoo BC, Kragler F, Varkonyi Gasic E, Haywood V, Archer Evans S, Lee YM, Lough TJ, Lucas WJ (2004) A systemic small RNA signaling system in plants. Plant Cell 16:1979–2000 <https://doi.org/10.1105/tpc.104.023614>

**Publisher’s Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



## OPEN ACCESS

## EDITED BY

Maria Celeste Gonçalves-Vidigal,  
Universidade Estadual de Maringá, Brazil

## REVIEWED BY

Kelvin Kamfwa,  
University of Zambia, Zambia  
Qijian Song,  
United States Department of Agriculture,  
United States

## \*CORRESPONDENCE

Patricia Valle Pinheiro  
patricia.pinheiro@embrapa.br

## SPECIALTY SECTION

This article was submitted to  
Plant Breeding,  
a section of the journal  
Frontiers in Plant Science

RECEIVED 02 July 2022

ACCEPTED 25 July 2022

PUBLISHED 25 August 2022

## CITATION

Ferreira AL, Faria JC, Moura MC,  
Zaidem ALM, Pizetta CSR, Freitas EO,  
Coelho GRC, Silva JFA, Barrigossi JAF,  
Hoffmann LV, Souza TLPO, Aragão FJL and  
Pinheiro PV (2022) Whitefly-tolerant  
transgenic common bean (*Phaseolus  
vulgaris*) line.

*Front. Plant Sci.* 13:984804.

doi: 10.3389/fpls.2022.984804

## COPYRIGHT

© 2022 Ferreira, de Faria, da Costa Moura,  
de Mendonça Zaidem, Pizetta, de Oliveira  
Freitas, Coelho, Silva, Barrigossi, Hoffmann,  
de Souza, Aragão and Pinheiro. This is an  
open-access article distributed under the  
terms of the [Creative Commons Attribution  
License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or  
reproduction in other forums is permitted,  
provided the original author(s) and the  
copyright owner(s) are credited and that  
the original publication in this journal is  
cited, in accordance with accepted  
academic practice. No use, distribution or  
reproduction is permitted which does not  
comply with these terms.

# Whitefly-tolerant transgenic common bean (*Phaseolus vulgaris*) line

Amanda Lopes Ferreira<sup>1</sup>, Josias Correa de Faria<sup>2</sup>,  
Matheus da Costa Moura<sup>3</sup>,  
Antônia Lopes de Mendonça Zaidem<sup>3</sup>,  
Carolina Senhorinho Ramalho Pizetta<sup>4</sup>,  
Elínea de Oliveira Freitas<sup>4</sup>, Gesimária Ribeiro Costa Coelho<sup>2</sup>,  
Jose Francisco Arruda e Silva<sup>1</sup>,  
José Alexandre Freitas Barrigossi<sup>1</sup>, Lucia Vieira Hoffmann<sup>5</sup>,  
Thiago Lívio Pessoa Oliveira de Souza<sup>2</sup>,  
Francisco José Lima Aragão<sup>4</sup> and Patricia Valle Pinheiro<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Entomology, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, Brazil, <sup>2</sup>Laboratory of Biotechnology, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, Brazil, <sup>3</sup>Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brazil, <sup>4</sup>Laboratory of Genetic Engineering Applied to Tropical Agriculture, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brazil, <sup>5</sup>Laboratory of Biotechnology, Embrapa Algodão, Santo Antônio de Goiás, Brazil

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a staple food in Brazil with both nutritional and socioeconomic importance. As an orphan crop, it has not received as much research attention as the commodity crops. Crop losses are strongly related to virus diseases transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci*, one of the most important agricultural pests in the world. The main method of managing whitefly-transmitted viruses has been the application of insecticides to reduce vector populations. Compared to chemical vector control, a more sustainable strategy for managing insect-borne viruses is the development of resistant/tolerant cultivars. RNA interference has been applied to develop plant lines resistant to the whitefly in other species, such as tomato, lettuce and tobacco. Still, no whitefly-resistant plant has been made commercially available to date. Common bean is a recalcitrant species to *in vitro* regeneration; therefore, stable genetic transformation of this plant has been achieved only at low frequencies (<1%) using particle bombardment. In the present work, two transgenic common bean lines were obtained with an intron-hairpin construct to induce post-transcriptional gene silencing against the *B. tabaci* *vATPase* (Bt-*vATPase*) gene, with stable expression of siRNA. Northern blot analysis revealed the presence of bands of expected size for siRNA in leaf samples of the line Bt-22.5, while in the other line (11.5), the amount of siRNA produced was significantly smaller. Bioassays were conducted with both lines, but only the line Bt-22.5 was associated with significant mortality of adult insects (97% when insects were fed on detached leaves and 59% on the whole plant). The expression of the Bt-*vATPase* gene was 50% lower ( $p < 0.05$ ) in insects that fed on the transgenic line Bt-22.5, when compared to non-transgenic controls. The transgenic line did not affect the virus transmission ability of the insects. Moreover, no effect was observed

on the reproduction of non-target organisms, such as the black aphid *Aphis craccivora*, the leafminer *Liriomyza* sp. and the whitefly parasitoid *Encarsia formosa*. The results presented here serve as a basis for the development of whitefly-tolerant transgenic elite common bean cultivars, with potential to contribute to the management of the whitefly and virus diseases.

#### KEYWORDS

dry bean, *Bemisia tabaci*, RNA interference, insect pest management, *vATPase*

## Introduction

The whitefly *Bemisia tabaci* (Genn.; Hemiptera: Aleyrodidae) biotype MEAM1 is currently considered one of the most important crop pests worldwide, for several reasons, including its wide geographic distribution, in all continents, strong performance as a vector of plant viruses and ability to colonize several plant families. Moreover, this insect presents high adaptability to different environments and rapid selection of insecticide-resistant populations. Whiteflies are a threat to food security, especially for developing countries (De Barro et al., 2011). As a generalist insect, *B. tabaci* feeds on a wide range of host plants, including common beans, cotton, tomatoes and soybeans. For those reasons, in countries with a tropical climate, *B. tabaci* can be found in both cultivated areas and native vegetation throughout the year, placing this insect among the ten most invasive pests in the world (Chen et al., 2016). In addition to the direct constraint caused by feeding on the plant, the whitefly is responsible for the transmission of several plant viruses, which is considered the main damage associated with this insect in agricultural crops. *B. tabaci* is the exclusive vector of viruses from the genus Begomovirus.

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a staple food in Brazil with nutritional and food security importance, as a relevant source of protein. It is also a crop of substantial impact on the Brazilian agribusiness, because it is produced in all regions of the country, in three cropping seasons per year, with a diversified use of technology. The majority of the common bean production in Brazil is carried out in small-holder farmers, providing employment and income to family producers. On the other hand, the crop is also produced by industrial farmers, in larger areas, with supplementary irrigation mainly in the Central Brazil growing area.

One of the main challenges of the crop is the high incidence of virus diseases, the most important ones transmitted by *B. tabaci*. Losses of up to 100% have been reported due to damages associated with the Begomovirus bean golden mosaic virus (BGMV; Souza et al., 2016). In addition to this virus, the whitefly transmits other viruses to common beans and soybeans, such as the Carlavirus cowpea mild mottle virus (CPMMV) and a recently reported Cytorhabdovirus (Alves-Freitas et al., 2019; Pinheiro-Lima et al., 2020). Currently, the main method of managing whitefly-transmitted viruses has been the intensive use of insecticides to reduce the vector population. However, the intense

use of the same insecticide molecules, often not associated with other management techniques, has rapidly reduced the efficacy of insecticides and selected whitefly populations resistant to the majority of the active ingredients on the market, thus limiting the efficiency of chemical control. In recent years, there are no records of new insecticides to control this pest, which indicates a limitation in the development of new synthetic molecules. Furthermore, the excessive use of synthetic pesticides poses a risk to human health and to the environment, in addition to increasing production costs. It is not difficult to find reports of 20 applications per common bean crop season for the management of this insect pest (Souza et al., 2016).

A more sustainable strategy for pest management is the development of pest resistant/tolerant plant cultivars. Strategies for the development of commercial cultivars resistant/tolerant to whitefly-transmitted viruses have been developed, for example, the transgenic common bean cultivar BRS FC401 RMD, which is resistant to BGMV (Bonfim et al., 2007; Faria et al., 2016; Souza et al., 2016) and the tomato cultivar BRS Sena, tolerant to Begomoviruses (Quezado-Duval et al., 2014). However, considering the plasticity of the “virus transmission ability” phenotype of *B. tabaci*, as well as its high adaptation to a wide range of environments and hosts, plant breeding for resistance to plant virus may contribute to the virus disease management, but not to the management of other viruses transmitted by this insect vector. As an efficient vector of plant viruses, even a single adult whitefly is capable of carrying and transmitting different species of viruses, acquired from mixed-infected plants.

Although there is no commercially available whitefly-resistant plant line yet, some reports show the development of whitefly-resistant plants by stable genetic transformation, such as tomato, tobacco and lettuce (Ibrahim et al., 2017; Pizetta et al., 2021; Xia et al., 2021), but not common beans. Our team has developed the first transgenic common bean cultivar in the world, resistant to BGMV, which has recently been made commercially available. Although some common bean cultivars have been reported to present tolerance to the whitefly through antixenosis (Silva et al., 2014, 2019; Hoshino et al., 2017; Jesus et al., 2021), using interfering RNA (RNAi) to silence important genes in the insect is also a promising strategy, because it can be more specific to the target insect and generally leads to high mortality. Silencing the insect *vATPase* gene (Bt-*vATPase*), using RNAi in Hemipteran insects has proven to reduce survival and to interfere in the development of juvenile stages, including *B. tabaci*



(Thakur et al., 2014; Ibrahim et al., 2017). The ATPase enzyme is part of the family of ATP-dependent proton pumps located in a variety of eukaryotic cell membranes. It is responsible for controlling pH in intracellular compartments and its activity affects several cellular processes, such as intracellular membrane transport, processing and transport of neurotransmitters, as well as regulating the entry of viruses and microorganisms. Here we report the development of the first transgenic common bean line with tolerance to the whitefly *B. tabaci*, by silencing the insect *vATPase* gene, using RNAi. We generated two transgenic lines and one of them was tolerant to the whitefly, causing significant mortality of adult insects. The next step will be to transfer the transgene to elite common bean lines for possible commercial use by farmers after biosafety studies.

## Materials and methods

### Insect colonies

The whiteflies *Bemisia tabaci* MEAM1 biotype used in the experiments were originated from a colony on common bean (*P. vulgaris*, cv. Pérola), kept under screenhouse conditions, at Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, Brazil (16° 28' 00" S, 49° 17' 00" W; 823 m asl), as previously described (Pizetta et al., 2021). To obtain age-synchronized adult insects, plants containing whitefly eggs laid for 2 h were isolated in insect cages, after removing the adults, until reaching the fourth larval instar. Adult insects used in the mortality experiments were collected 1 day after the onset of adult emergence.

A colony of the black aphid *Aphis craccivora* was obtained from bean plants collected at Embrapa Arroz e Feijão and maintained on common bean plants isolated in insect cages. The whitefly parasitoid *Encarsia formosa* was obtained from a colony maintained on whitefly nymphs fed on kale (*Brassica oleracea*) plants.

### Genetic transformation

A partial sequence of 647 bp from the *B. tabaci v-ATPase* gene was cloned in sense and antisense orientations in the vector pSIU (Tinoco et al., 2010) generating pBtATPase, as previously described (Ibrahim et al., 2017), for genetic transformation of the common bean (Supplementary Figure S1). The ATPase interference cassette is under the control of the doubled 35SCaMV promoter with an enhancer sequence from the alfalfa mosaic virus (dCaMV35S) and the terminator is that of the *nopaline synthase* gene (*nos*). The selection gene used was the *Atahas*, with the complete promoter and terminator from *Arabidopsis thaliana*, conferring tolerance to the herbicide imazapyr. The RNAi construct will be referred to as  $\Delta$ ATPase from now on.

Genetic transformation of the common bean cultivar Olathe Pinto was performed as described (Aragão et al., 1996; Bonfim

et al., 2007). Briefly, common bean seeds were surface disinfested in 70% ethanol (V/V) for 1 min, followed by immersion in 2.5% sodium hypochlorite for 10 min. Soon after, three washes were performed using sterile water. After the last wash, the seeds were soaked in sterile water for approximately 18 h. After this period, the seed embryonic axis was excised and their apical meristems exposed after the removal of the primordia of the primary leaves (plumule), with the aid of a stereoscopic microscope. Then, they were placed in sterile Petri dishes (60x15mm) containing MS medium amended with phytigel, with the apical meristem facing the center of the dish. Particle bombardment of DNA was performed using a particle accelerator as described by Sanford (1990), Klein et al. (1992). Embryos were transferred to plant tissue culture containers with selective culture medium containing 6-benzylaminopurine (BAP; 10 mg/l) and imazapyr (80 nm), which were kept in a growth chamber at 24°C and 16 h photoperiod. The explants that developed and were positive for the presence of *Atahas* gene by PCR were transferred to a container with sterile substrate, covered by a plastic bag that was gradually removed so that the explants could acclimate to the environment. After this process, they were transferred to pots with soil and fertilizer and kept in a greenhouse to complete the development and for PCR analysis. For that, DNA was isolated from leaf tissues as described (Dellaporta et al., 1983) and amplified by PCR with the following pair of primers: AHASPI24F 5'ACTAGAGATTCAGCGTCAC3' and AHAS500CR 5'GTGGCTATACAGATACCTGG3' for the detection of the selection gene *Atahas*. Thermal cycling conditions were denaturation at 95°C for 15 min followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 56°C for 1 min, 72°C for 1 min, and 60°C for 30 min.

### Progeny analysis

Segregation ratio was evaluated at the second and third generations ( $T_2$  and  $T_3$ ) of self-pollinated transformed plants, analyzing the presence of the  $\Delta$ ATPase by PCR, as described. Pearson's Chi squared ( $\chi^2$ ) was used to determine whether the observed segregation ratio was consistent with a Mendelian ratio of 3:1, at 95% level of confidence. Homozygous plants were used for the reported bioassays.

### Production of $\Delta$ ATPase siRNAs

Leaf samples from 10-day-old plants were collected in liquid nitrogen for total RNA isolation, using Trizol (Invitrogen), as recommended by the manufacturer. Non-transgenic plants with the same genetic background (cv. Olathe pinto) and the same age were used as controls. SiRNA analysis was performed as described (Bonfim et al., 2007; Pizetta et al., 2021), using a DNA probe corresponding to the *vATPase* PCR fragment, which was amplified using the primer

pair ATPXS1 (TTCTAGAGCTCTATCACACTATCTGAGT AC)/ATPSK1 (GGTACCCTAGTGGGAAGTTTTATCGTAG) labeled with  $\alpha^{32}\text{P}$  dCTP and the DecaLabel DNA Labeling Kit (Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. The bands were visualized with a fluorescent image analyzer (FLA-3000; Fujifilm).

## Whitefly mortality assays

Two sets of bioassays were conducted for each common bean transgenic line, the first one using detached leaves and the other with the whole plant. To keep the detached leaves during the experiments, a bioassay system was developed using 50 ml Falcon tubes, containing 1.5 ml microtubes fixed to the bottom (Figure 1A). The detached leaves were accommodated with the petioles inside the microtubes containing water (Figures 1B,C) and the system was covered with voile fabric. Each replicate consisted of one detached leaf from an individual transgenic or non-transgenic plant ( $n=15$ ) and 20 two-day-old adult insects carefully collected from the colony with the aid of 15 ml Falcon tubes with one end opened (Figure 1D). The evaluations were carried out 5 days after the assembly of the assay, counting the number of live and dead adults on the leaves (Figure 1E), with the

aid of an insect aspirator. This bioassay was repeated twice for each transgenic line.

For the experiments with whole plants, transgenic and non-transgenic plants ( $n=10$ ) with the primary leaves fully expanded were submitted to whitefly oviposition for 1 h. After that, adult insects were removed from the leaves and plants were kept on a growth chamber (25°C and 16h:8h light/dark photoperiod) during the insect development from egg to adult, for about 20 days. When the insects reach the fourth instar, plants were isolated in individual cages, made of plastic cups covered with voile fabric, to avoid the escape of adult insects (Figures 1F,G). 7 days after adult emergence, the numbers of live and dead adults and empty pupae were counted on each plant.

## Gene silencing in insects

The expression levels of the *vATPase* gene in *B. tabaci* feeding on transgenic ( $T_3$  generation; line Bt-22.5) and non-transgenic common beans were determined by qRT-PCR. About 150 two-day-old adult insects were transferred to transgenic and non-transgenic plants ( $n=3$ ) isolated in individual cages. After 48 h, insects were collected using an insect aspirator coupled to microtubes, which were immediately placed on liquid nitrogen.

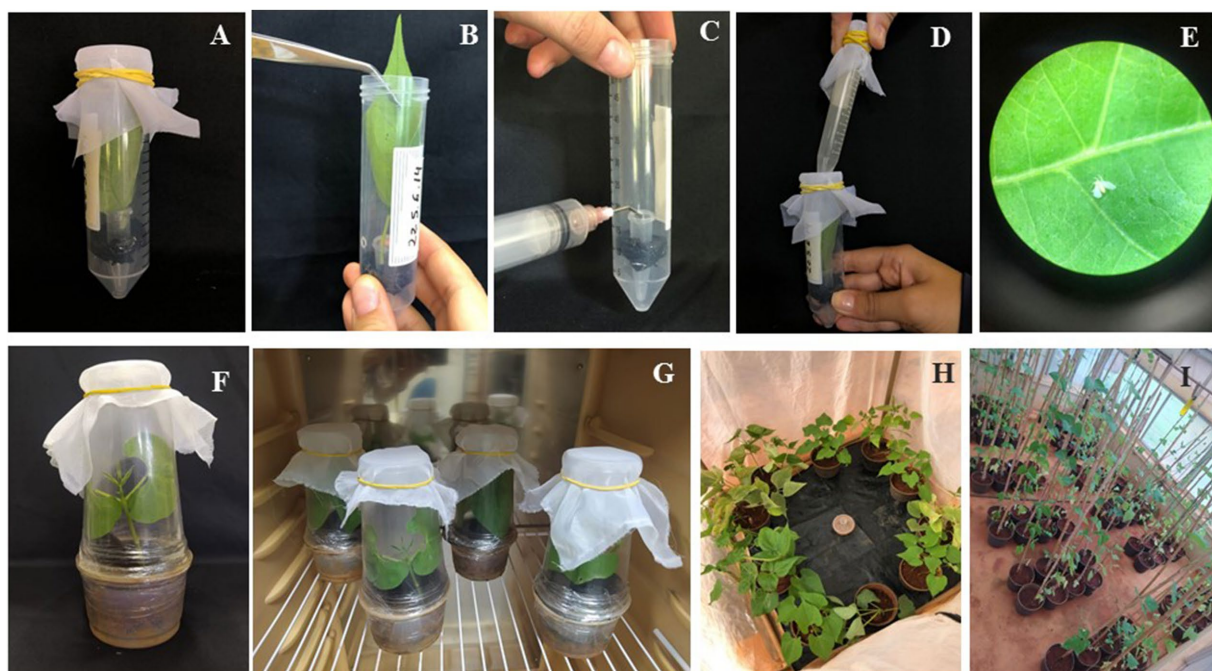


FIGURE 1

Whitefly mortality and preference assays. (A) Bioassay system developed to conduct the insect mortality assays with detached leaves of the transgenic common bean lines, with voile fabric covering the upper part of the tube; (B) Plant leaf being inserted into the bioassay system; (C) Microtube used to place water and maintain the leaf for the period of the evaluations; (D) Release of adult insects inside the Falcon tube; (E) Close-up photo of dead insect on GM bean leaf; (F) Plastic cup cage to isolate the plants; (G) Plants in the growth chamber for the whole-plant experiment; (H) Transgenic and non-transgenic common bean plants randomly distributed in a circle under a large voile cage, where insects were released in the center, for the preference assays and (I) Transgenic and non-transgenic common bean plants distributed in blocks in the greenhouse for the experiment during the common bean cycle.

Total RNA was isolated from ~150 adult insects/replicate, and 200 ng of RNA from each sample were used to synthesize the cDNA with the Promega GoScript Reverse Transcription System kit, according to manufacturer's instructions. PCR reactions were performed using the Step OnePlus real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific) with SYBRGreen detection. Primers for the *vATPase* and *actin* genes were designed using the PrimerQuest tool (IDT Integrated DNA Technologies, Inc.), as described (Pizetta et al., 2021). The relative levels of *vATPase* transcription in the different RNA samples were normalized in relation to the *actin* gene, an internal standard. Quantitative assays were performed using three biological samples. The relative level of expression was calculated using the Livak method (Livak and Schmittgen, 2001).

## Preference and oviposition assays

Pots with transgenic or non-transgenic plants ( $n=5$ ) were placed inside a large voile fabric cage (1.5 mL  $\times$  1.5 mW  $\times$  1.5 mH), in a circle, randomly distributed (Figure 1H). In the center of the cage, 400 adult whiteflies were released. The number of adult insects sitting on the primary leaves of the plants was counted 48 h later, using a small mirror to prevent the insects from leaving the plants due to the movement of the foliage. After counting the number of adults, one leaf of each plant was removed and taken to the laboratory for egg counting under a stereoscopic microscope.

## Effect of the transgenic common bean line on virus transmission by the whitefly

To evaluate the potential effect of silencing the *vATPase* gene in the whitefly on virus transmission by the insect, we conducted transmission assays with two economic important viruses of common beans: cowpea mild mottle virus (CPMMV), which has a mild effect on common beans, and bean golden mosaic virus (BGMV), which cause a severe mosaic and stunting on susceptible plants. Common bean plants cv. BRS Pérola, susceptible to both viruses, were used as the inoculum source. After an acquisition period of 24 h, viruliferous whiteflies were transferred to two individual cages, one of them containing a common bean plant from line Bt-22.5 and the other one containing a non-transgenic common bean Olathe plant. Insects were kept on these two treatments for 48 h. After that, 100 insects were transferred from each treatment to larger cages, containing 30 recipient plants (Olathe Pinto, non-transgenic) for a 24 h inoculation period. Then, all adult insects were manually removed from the plants, using an insect aspirator, and plants which were kept in cages for 25 days, for virus infection evaluation. Virus incidence was assessed by visual symptoms, using a 1–4 scoring scale, in which 1 = no symptom, 2 = light symptoms, 3 = moderate symptoms and 4 = strong symptoms (Arias et al., 2015). Virus detection was analyzed on symptomatic and asymptomatic plants ( $n=12$ )

by PCR and RT-PCR, using the primers CPMMV-F (5'ACGTCTCGAGCTGGAGTCAGTGTGTTG3'/CPMMV-R (5'ACGTGAATTCTTACTTCTTAGCGTG3') and BGMV\_pAC1v 1978 (5'GCATCTGCAGGC CCACATYGTCTTYCCNGT 3') / BGMV\_pAV1c715 (5'GATTTCTGCAGTTDATRTTYTCRT CCATCCA 3').

## Effect of the transgenic common bean line on two whitefly generations

A greenhouse experiment was carried out to simulate the effect of the transgenic line Bt-22.5 on the whitefly population in the field, because the field release has yet to be requested to the Brazilian National Biosafety Technical Commission (CTNBio). The experiment was carried out in a randomized block design. Transgenic and non-transgenic seeds, 48 of each, were sown in large plant pots and randomly distributed in six blocks inside the greenhouse, to mitigate the potential effect of spots with different light incidence. Each block was composed by 8 plants of each treatment (Figure 1I). When the plants had the two primary leaves fully expanded, kale plants hosting fourth instar nymphs of the whitefly were randomly distributed among the blocks, so that the emerging adults could freely move to the common bean plants. The whitefly-source kale plants were kept in the greenhouse for 2 days and then they were removed. The number of adult whiteflies sitting on the plants were sampled in 18 plants/treatment weekly. From the third week on, leaves from 18 different plants/treatment were randomly collected every week and analyzed in the lab, using a stereoscope microscope, to count the number of eggs, nymphs and empty pupae. Data were collected weekly, until the plants enter the R8 stage (pod filling), comprising 2.5 whitefly generations. Pods from three plants/treatment/block were harvested at the end of the plant cycle to evaluate the number of pods per plant, seeds per pod and mass of 100 seeds. Seed mass was corrected at 13% moisture. The mass of 100 seeds was estimated from the mass of seeds collected from three plants.

## Bioassays with non-target organisms

To evaluate the potential effect of the transgenic common bean line Bt-22.5 on a non-target organism that feeds directly on bean leaves, with a feeding habit similar to the whitefly, we evaluated the reproduction of the black aphid *A. craccivora*. Five 4th instar nymphs of *A. craccivora* were carefully transferred to each primary leaf of transgenic (Bt-22.5) and non-transgenic (cv. Olathe Pinto) plants ( $n=4$ ), using a soft wet paintbrush. Leaves were isolated with individual little bags, made of voile fabric. Plants were then kept on a growth chamber at 25°C and 16 h light: 8 h dark photoperiod. 7 days later, the total number of aphids in each plant was counted using a stereoscope microscope. In another set of experiments, the whitefly parasitoid *E. formosa* was used to evaluate a potential

indirect effect of the transgenic common bean line to a beneficial non-target organism. Transgenic and non-transgenic common bean plants ( $n = 10$ , considering each primary leaf as a replicate), with their primary leaves fully expanded, were submitted to whitefly oviposition for 2 h. After that, the adults were removed and plants were isolated in cages. The apical leaves were pruned to avoid excessive plant growth. When the nymphs reached the 3rd instar, the plants were randomly distributed in a circle, in the middle of which a kale (*Brassica oleracea*) plant containing adults of *E. formosa* was placed, so that the parasitoids could move to the common beans to parasitize the whitefly nymphs. 2 days later, the adult parasitoids were manually removed from the common bean plants, using an insect aspirator. After 12 days, close to the parasitoid emergence, common bean leaves were collected to sample the number of parasitized nymphs and non-parasitized nymphs. These experiments were repeated twice and data from both experiments were analyzed together.

Additionally, during the greenhouse experiment to look at the effect of the transgenic line Bt-22.5 on the whitefly over two generations, a natural infestation of the leafminer *Liriomyza* sp. occurred, severely damaging the plants, because the common bean cultivar Olathe Pinto is highly susceptible to this insect pest and it was not possible to use insecticides without affecting the whitefly population. Then we included an assessment of the occurrence of the *Liriomyza* sp. larvae on the transgenic and non-transgenic plants, as another non-target insect species. The number of larvae was counted in three leaves per plant, and 3 plants/block ( $n = 18$ ). The level of damage on the leaves was evaluated in the same leaves ( $n = 18$ ), using a scoring scale from 1 to 4 (1 = no mining; 2 = a few mines in less than 20% of the leaflets, no defoliation; 3 = mines present in up to 50% of the leaflets, some defoliation leaflets; 4 = many mines in almost all the leaflets (90%) and defoliation of greater than 31%), adapted from (Singh and Weigand, 1994).

## Statistical analysis of the bioassays data

The homogeneity of variances was verified by the Levene test and data normality by the Shapiro–Wilk test. Means of normally distributed data were compared using the t test ( $p < 0.05$ ). Non-parametric data was analyzed using the Wilcoxon test. In the preference assay, the number of eggs and adults was modeled using the GLM with Binomial Negative distribution. In the experiment to look at the whitefly generations on the common bean plants, the total number of adult insects, eggs, empty pupae and nymphs per treatment were analyzed using the above mentioned tests, considering block effects. For the scoring scales, the analysis was performed considering the frequency of each of the scoring scale per treatment. These frequencies were compared by the chi-square value and by a proportion test, where the null hypothesis indicated that the percentage of plants with a certain score was

similar in the two treatments. All statistical analysis were performed using the R software (R CORE TEAM, 2019).

## Results

### Analysis of common bean transgenic plants

In 44 transformation attempts, 8,764 explants were subjected to particle bombardment for genetic transformation. Of these, only nine  $T_0$  plants were positive for the presence of the  $\Delta vATPase$  transgene, resulting in a low rate of transformed plants (0.1%), as expected (Russell et al., 1993; Aragão et al., 1996). From the nine  $T_0$  plants, only two transmitted the transgene to the progeny ( $T_1$ ). These two lines were named 11.5 and Bt-22.5. Among the 9  $T_1$  plants of the line 11.5 obtained, 7 plants were positive for the transgene, while for the line Bt-22.5, 3 of the 7 plants were positive. Seeds collected from individual self-pollinated  $T_1$  plants were sowed for the progeny analysis of the  $T_2$  (line Bt-22.5) and  $T_3$  (line 11.5) generations ( $n = 20$ ). Most of these lines did not segregate as expected (Table 1). However, all 20 plants from the progeny of the line Bt-22.5 were positive for the selection gene *Atahas*, indicating that this line was homozygous for the transgene  $\Delta ATPase$  (Table 1; Figure 2A). A similar pattern was observed for line Bt-22.5.6, in which, 19 of the 20 plants were positive for the transgene (Table 1).

Northern blot analysis revealed that plants from lines 11.5 and Bt-22.5 produced siRNA bands corresponding to the expected size range (Figure 2B). However, the siRNA band from line 11.5 was weaker than that of line Bt-22.5. No signal was observed for the non-transgenic control plants.

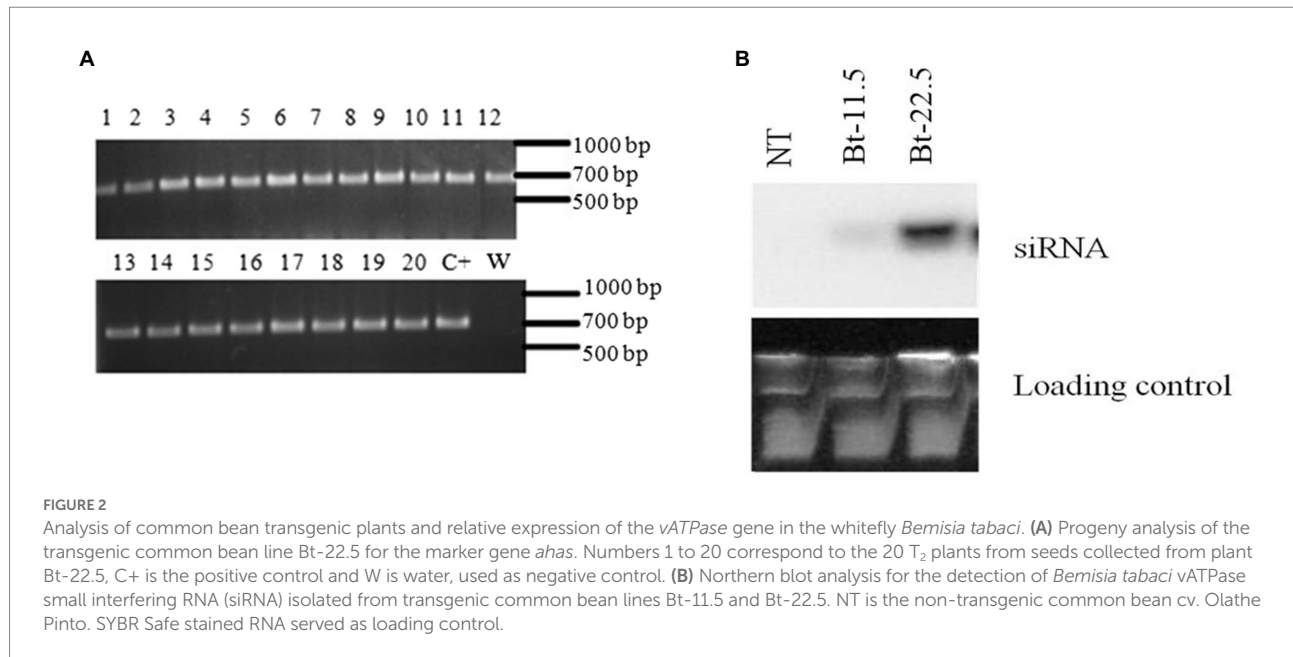
For the transgenic line Bt-22.5, no phenotypical difference was observed, compared to the non-transgenic plants. Additionally,

TABLE 1 Progeny analysis of  $T_2$  and  $T_3$  generations of transgenic common bean cv. Olathe Pinto lines ( $n = 20$ ).

Common bean line	Generation	Positive <sup>a</sup>	Negative <sup>a</sup>	$\chi^2$	$P^b$
11.5.1.3	T3	12	8	1.7	0.200
11.5.2.4	T3	8	12	11.3	0.001
11.5.3.5	T3	10	10	5.4	0.020
11.5.4.19	T3	9	11	8.1	0.005
11.5.5.12	T3	15	5	0.0	1.000
11.5.6.21	T3	10	10	5.4	0.020
11.5.7.23	T3	7	13	15.0	0.0001
Bt-22.5.6	T2	19	1	3.3	0.07
Bt-22.5.5	T2	20	0	5.4	0.020
Bt-22.5.2	T2	10	10	5.4	0.020

<sup>a</sup>Data are based on PCR analysis for detection of the  $\Delta ATPase$  transgene.

<sup>b</sup>Probability of the observed segregation fits the expected 3:1 Mendelian ratio at 95% confidence interval.



the number of pods per plant, seeds per pod and the mass of 100 seeds did not present significant difference between treatments (Supplementary Table S1).

## Effect of the transgenic plants on the whitefly

Mortality of adult whiteflies was significantly higher in the transgenic common bean line Bt-22.5 both for the detached leaf and for the whole plant experiments (Figure 3), compared to the controls. The experiment with detached leaves resulted in a higher mortality (97%) than the experiments with the whole plant assays (59%; Figure 3). In contrast, when insects fed on detached leaves of the line 11.5, mortality was not different from that observed in the control plants (data not shown).

Expression of the *vATPase* gene in insects was significantly reduced when they fed on the transgenic common bean line Bt-22.5, less than half of the expression observed in insects that fed on the control plants (Figure 4). In the preference assay, a reduced proportion of adult whiteflies (27.6%) and eggs (25.9%) was observed, on average, on the transgenic plants compared to the number of insects sampled on the control plants (data not shown). In the experiment to look at the whitefly generations during the cycle of the common bean plants, 2.5 whitefly generations were evaluated. The total number of eggs, empty pupae and nymphs did not differ between transgenic and non-transgenic plants (Figure 5A). However, the total number of adult insects was significantly lower on the transgenic plants (Figure 5A). Accordingly, the average number of adults per treatment was significantly higher on the control plants in four of the eight sampling dates (Figure 5B). Remarkably, when the second-generation adults

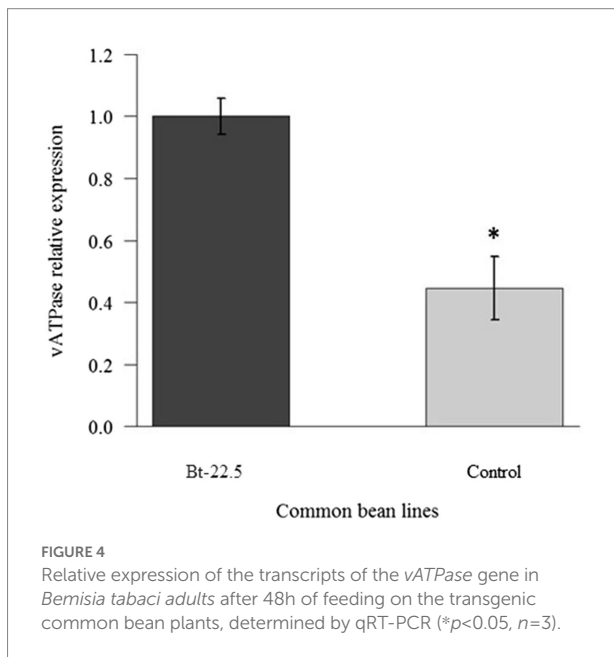
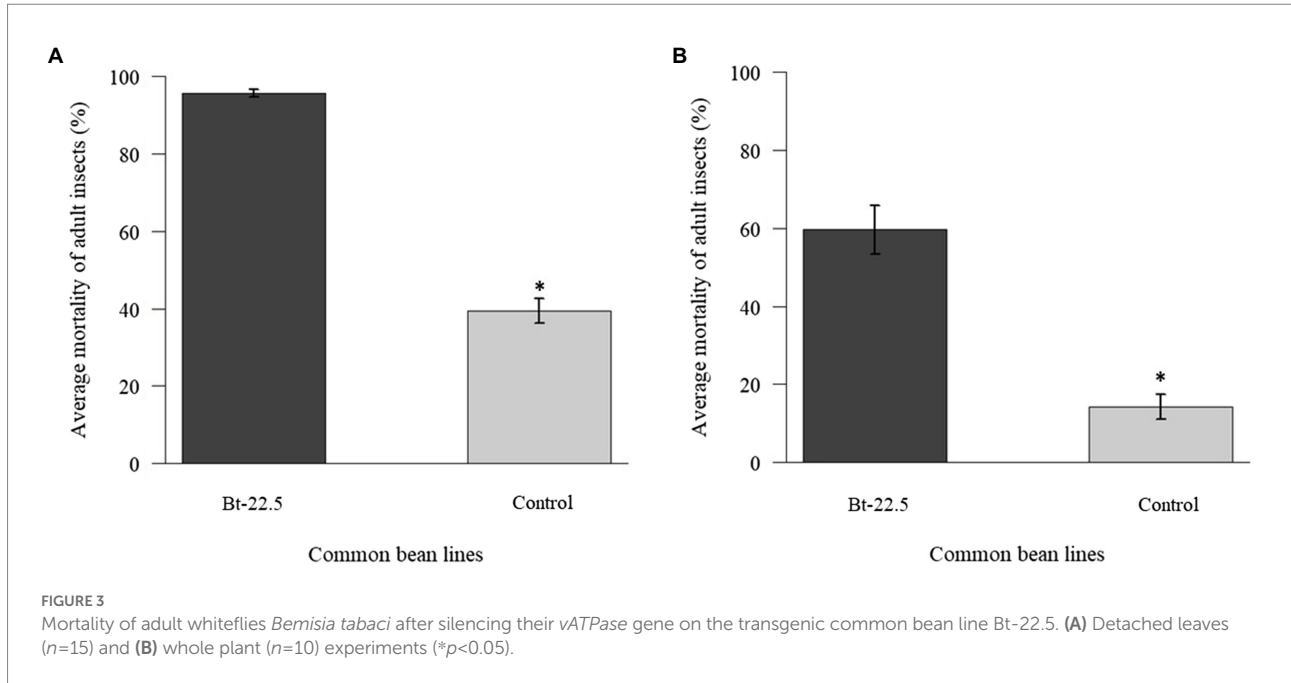
began to emerge (May 3rd and May 9th), the population increased significantly faster in the non-transgenic controls, until the number of adults almost coincided in the last sampling date.

## Effect of the transgenic common bean line Bt-22.5 on virus transmission by the whitefly

Visual symptoms of virus disease were observed in 61.2% of the non-transgenic plants, while in the transgenic plants only 45.5% of the plants virus symptoms (non-significant; Table 2). For the plants that presented virus symptoms, the proportion of plants in each virus disease severity score was not different between treatments (Figure 6). Although many plants were asymptomatic, PCR analysis showed that the proportion of plants infected with CPMMV and BGMV did not differ between treatments (transgenic vs. non-transgenic; Table 2).

## Non-target organisms

The reproduction of the black aphid *A. craccivora*, a non-target insect pest, was unaffected after feeding on the common bean transgenic line Bt-22.5 for 7 days ( $p < 0.05$ ; Figure 7A). In the bioassays with the whitefly nymph parasitoid *E. formosa*, the number of parasitized whitefly nymphs in the transgenic plants was not significantly different from that of the non-transgenic plants (Figure 7B). Additionally, the average number of *Liriomyza* sp. larvae on the transgenic and non-transgenic plants was not significantly different (Figure 7C). Also, both transgenic and non-transgenic plants were similarly damaged by the leafminer

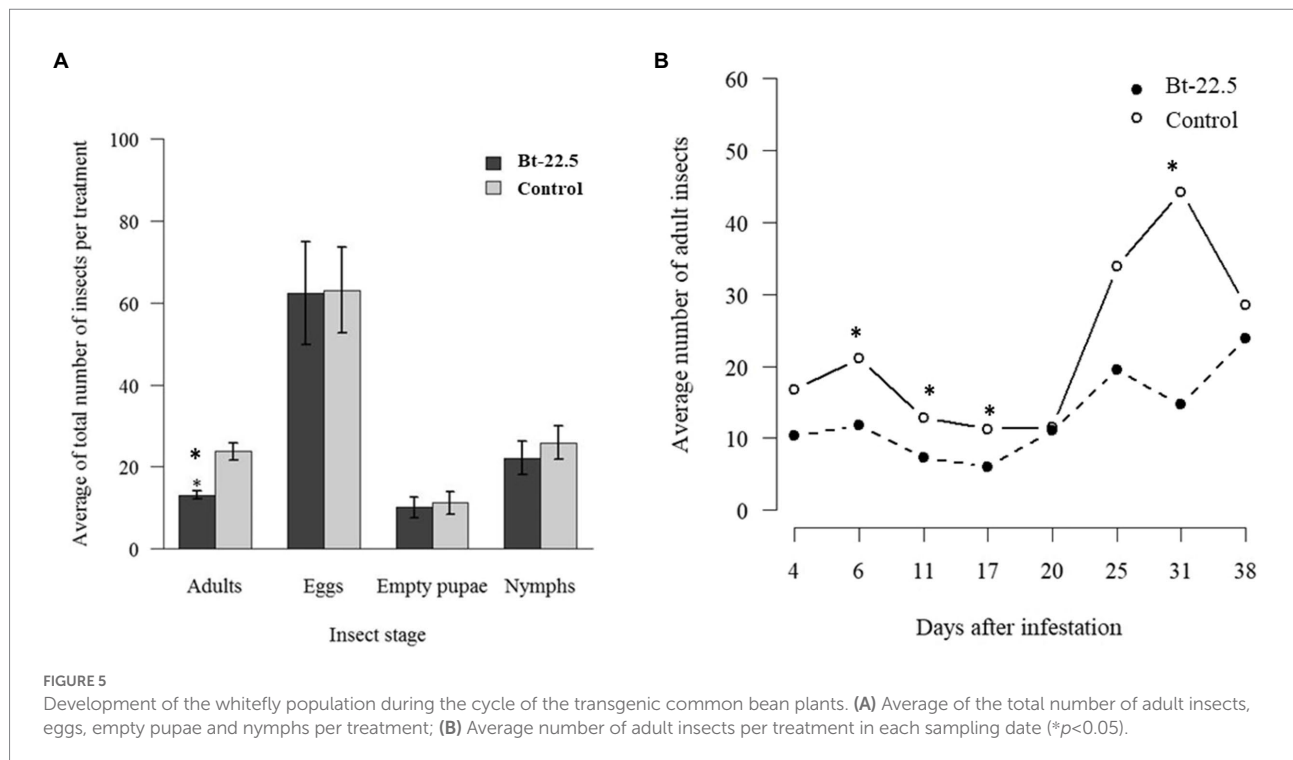


larvae, with no difference on the level of damage they caused on the plants (Figure 7D).

## Discussion

Common bean is a staple food in Brazil, with social and economic importance. The crop is produced all over the country, in three growing seasons per year, which means that insect pests have a favorable environment to reproduce and keep high

populations throughout the year. Whitefly management in the common bean crop is particularly relevant, because this insect is a vector of viruses that can severely impair crop yield and grain quality (Souza et al., 2016). Chemical control of the insect population has been the most used control method, although alternatives have been developed, such as biological control and virus resistant common bean cultivars (Faria et al., 2016; Souza et al., 2018; Sani et al., 2020; Silva et al., 2022). Common bean cultivars with tolerance to the whitefly through antixenosis have been reported, resulting in reduced number of eggs, nymphs and adults sitting on the plants, in field assays (Silva et al., 2014, 2019; Hoshino et al., 2017; Jesus et al., 2021). In spite of the identification of these sources of tolerance in the common bean germplasm, no common bean cultivar has been developed or registered for resistance to the whitefly, to date. Using RNAi to silencing genes in the insect might be a more specific and durable strategy, with potential to cause high insect mortality. The whitefly *B. tabaci* is a highly efficient vector of plant viruses, able to transmit numerous viruses from mixed-infected plants with different levels of efficiency. Some of these viruses are transmitted by the whitefly in a non-persistently manner, which means that the virus acquisition period is very short (1 to 3 min). Insect probing behavior plays a major part in this mode of transmission, meaning that even brief probes can be sufficient for a quick plant-to-plant spread of these viruses. Considering this insect-virus mode of interaction, a strategy aiming to cause insect mortality is more promising for virus disease management. Plant genetic transformation for gene silencing *via* RNAi is a viable option to achieve significant insect mortality rates and it has been successfully used to obtain stable transgenic whitefly-resistant plants, such as tomato and lettuce (Ibrahim et al., 2017; Pizetta et al., 2021; Xia et al., 2021), but not common beans, so far.



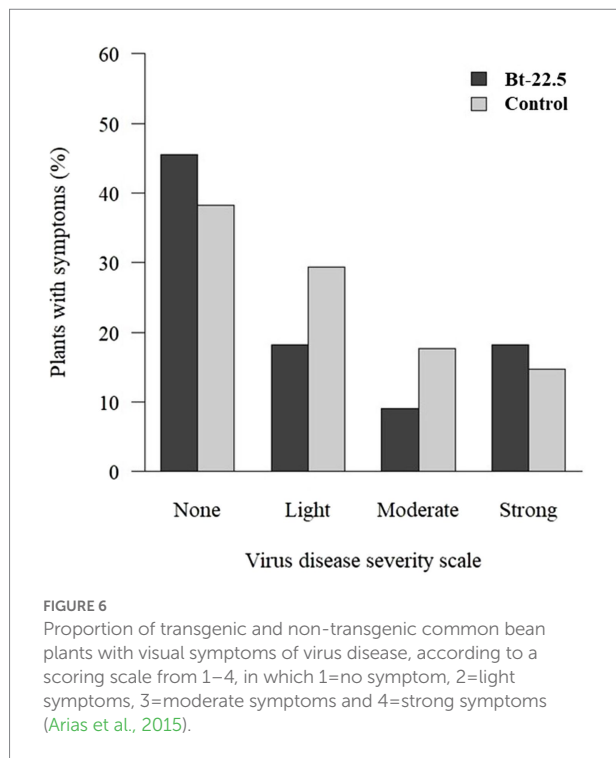
**TABLE 2** Proportion of common bean cv. Olathe Pinto plants (non-transgenic) with virus symptoms, positive for BGMV and CPMMV by PCR, after inoculation by viruliferous whiteflies previously fed on the transgenic common bean line Bt-22.5 or on the non-transgenic plants for 48h.

Virus detection	Transgenic line Bt-22.5	Non-transgenic line	Value of p
Plants with virus symptoms	10/22 (45.5%)	21/34 (61.2%)	0.355544
BGMV <sup>+</sup> plants	2/12 (16.7%)	3/12 (25%)	0.932414
CPMMV <sup>+</sup> plants	12/12 (100%)	12/12 (100%)	NA

Our results show the development of the first common bean transgenic line with tolerance to the whitefly *B. tabaci*. Stable transformation of grain legumes has been considered a challenge (De Clercq et al., 2002). Because the common bean *P. vulgaris* is recalcitrant to *in vitro de novo* regeneration from callus, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of common beans is still difficult to achieve and therefore, the most reliable technique that made it possible obtaining a commercial cultivar of transgenic common bean, to date, was particle bombardment (Aragão et al., 1996; Faria et al., 2016). This technique presents a lower transformation rate, compared to *A. tumefaciens*-mediated genetic transformation of other plant species (De Clercq et al., 2002). Accordingly, in our experiments, only two stable transgenic common bean lines were obtained, that is, which passed the transgene to their progeny, representing an efficiency rate of 0.02%. From those, only one of them presented a significant amount of targeting siRNA, associated with a

significant insect mortality and silencing of the target gene in the insects. These results are in agreement with the gene silencing ability of the other transgenic plant species, lettuce and tomato, that our team previously engineered using the same genetic construction (Ibrahim et al., 2017; Pizetta et al., 2021). In lettuce, silencing of the whitefly *vATPase* gene was associated with higher mortality, from 83.8–98.1% (Ibrahim et al., 2017), while in tomato, insect mortality was similar to our current results with the common bean line Bt-22.5, about 60% (Pizetta et al., 2021). Silencing of the *vATPase* gene has been reported as an efficient method to interfere with survival and development of the whitefly *B. tabaci* (Upadhyay et al., 2011; Thakur et al., 2014), although it seems to be more effective on adult insects. Significant mortality of 2nd instar nymphs was reported for the transgenic tomato, while the transgenic lettuce also delayed the whitefly development from nymphs to pupae (Ibrahim et al., 2017; Pizetta et al., 2021). In the current work, no significant difference in the survival or development of the whitefly young stages was observed on the transgenic common bean lines (data not shown). The other common bean line obtained in the current work, named 11.5, although positive for the transgene, produced a smaller amount of siRNA and did not cause significant insect mortality. This might be related to the DNA integration site, number of transgene copies and other inherent obstacles of plant genetic transformation. The transgenic plants did not present any other phenotypical difference from the non-transgenic plants.

Conducting mortality experiments with adult whiteflies is challenging because *B. tabaci* is a small, fragile and highly mobile insect, which makes it difficult to handle the insects without damaging their stylets, for example, when using an



insect aspirator. Also, it is difficult to visualize dead insects on the plant or in the soil because the tiny whiteflies disintegrate very quickly. Therefore, we tested different methods for the mortality experiments, such as using detached leaves, to reduce the space in which the dead insects would be located. However, the detached leaf experiments resulted in high mortality rates, which could be artificial. To check that, we developed another methodology to conduct the experiments using whole plants and minimal insect handling. For that, we exposed the plants to adult whiteflies for oviposition and then, we removed the adults and waited until the nymphs developed into a new generation of adults on the plants. This methodology has the advantage of minimally disturbing the insects while they develop from egg to adult on the transgenic plant, thus increasing the exposition time of insects to the transgene and also reducing the mortality due to random effects in the controls. Our results show insect mortality on the common bean line Bt-22.5 was higher on the experiment with detached leaves, in comparison with the experiment with whole plants. Even so, the mortality in the whole plant indicates a good level of tolerance to the insect, which can contribute to pest management, along with other management tools already available. Accordingly, in other studies the two methods of bioassays generally show a positive data correlation, although in some cases the responses point to more or less pronounced effects, depending on the target organism (Sharma et al., 2005; Michel et al., 2010; Miller-Butler et al., 2018). Also, for distinguishing resistant from susceptible genotypes, the two methodologies generally correlate well. This is in agreement with our observations, which show that the experiments with detached leaves were useful to select the most

promising resistant lines for further confirmation with the whole plant methodology. Some variation can still be found in future experiments, depending on uncontrolled field and climate conditions.

In the preference assay, the number of adult insects and the number of eggs were reduced on the transgenic common bean line Bt-22.5, which is in agreement to the lower oviposition reported for the transgenic lettuce and tomato, genetically engineered with the same RNAi construct (Ibrahim et al., 2017; Pizetta et al., 2021). Corroborating this result, in the experiment to look at the whitefly generations during the cycle of the common bean plants, the total number of adults and the number of adults per sampling date were lower on the transgenic plants, suggesting that these plants contributed to reduce the whitefly population and the start of the second generation. A similar pattern was observed in the study with the transgenic lettuce resistant to the whitefly, although in that study, the number of insects from all stages were lower on the transgenic plants (Ibrahim et al., 2017). However, most studies on the development of transgenic plants in the literature do not report the effect of gene silencing over insect generations, or during the plant life cycle.

Regarding virus transmission, our results show that feeding on the transgenic plant did not affect the whitefly ability to transmit two viruses, in different modes (circulative and non-circulative). In fact, silencing the *vATPase* gene in the insect was not expected to affect virus transmission, because this gene has not been reported to be as relevant for the vectoring ability of Hemipterans as other genes, such as *HSP70*, *cathepsin B*, *cyclophilin B* and  *$\alpha$ -glucosidase* (Götz et al., 2012; Chen et al., 2016; Pinheiro et al., 2017; Hasegawa et al., 2018; Kanakala et al., 2019; Lu et al., 2021). A transcriptomic study showed that the *vATPase* gene was not differentially expressed in whiteflies that acquired the tomato chlorosis virus (ToCV), compared with insects that fed on non-infected plants (Kaur et al., 2017). The variation in the level of virus symptoms in the plants that we observed in the present study are similar to natural infections in the field and may be explained by other factors, for example, environmental effects, number of insects feeding on each plant and viral load variation among insects.

Furthermore, the transgenic common bean line Bt-22.5 did not cause unexpected effects on the reproduction and development of three non-target organisms. Two of these insect species are also considered as insect pests: the black aphid *A. craccivora*, which has a feeding habit similar to the whitefly, and the leafminer *Liriomyza* sp. Our results are in agreement with the non-target assays conducted for the whitefly-resistant transgenic tomato lines with different non-target organisms, also insect pests, such as the green peach aphid *Myzus persicae*, the spider mite *Tetranychus urticae* and the tomato leafminer *Tuta absoluta* (Pizetta et al., 2021; Xia et al., 2021). This suggests that even for the organisms with similar *vATPase* gene sequences, silencing of the *B. tabaci vATPase* was specific to the target species. The other non-target organism evaluated is a beneficial insect, the parasitoid of whitefly nymphs *E. formosa*. Our results show that silencing the whitefly *vATPase* did not affect the ability of the parasitoid to reproduce in the whitefly nymphs.



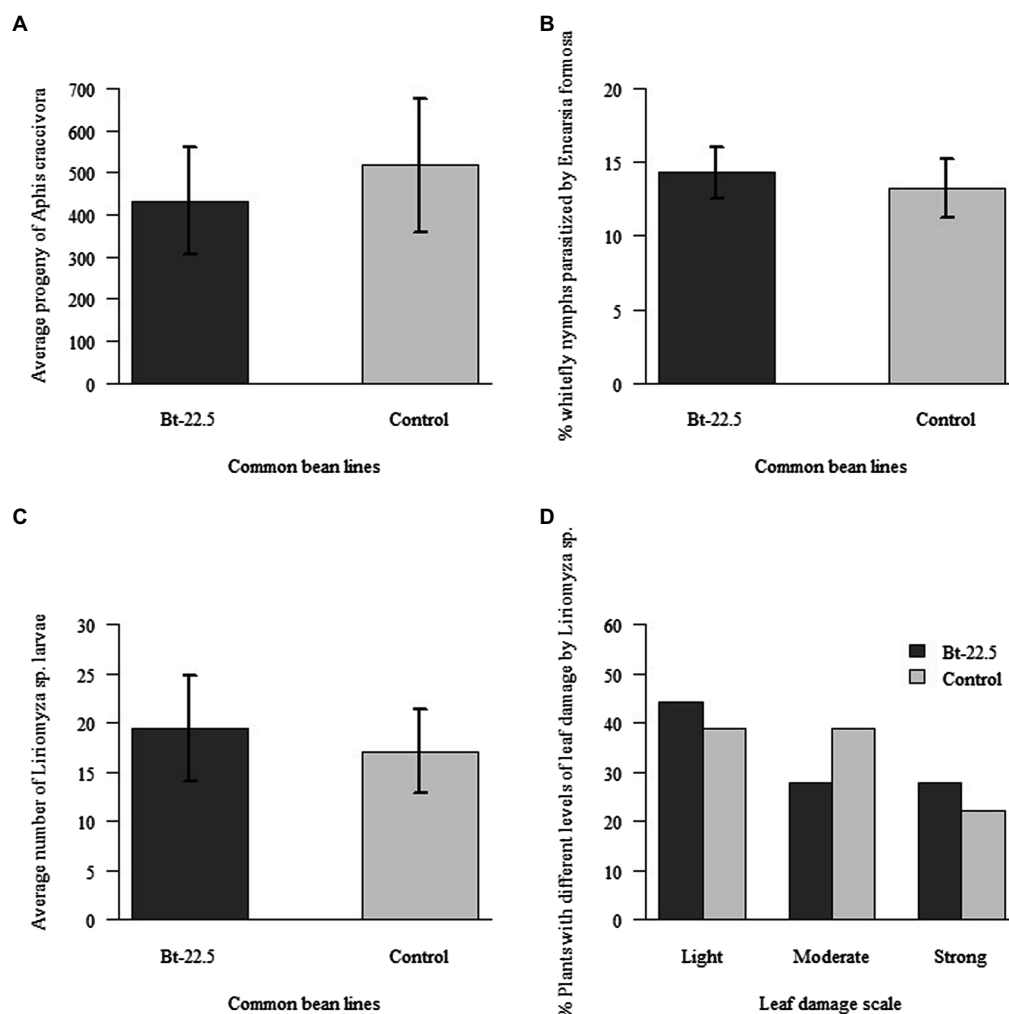


FIGURE 7

Development of non-target insects on plants of the transgenic common bean line Bt-22.5 expressing an RNAi construct for the silencing of the whitefly *Bemisia tabaci* *vATPase* gene, compared to the non-transgenic control: (A) Average progeny of the black aphid *Aphis craccivora* ( $n=3$ ); (B) Average percent of whitefly nymphs parasitized by *Encarsia formosa* ( $n=3$ ); (C) Average number of larvae of the leafminer *Liriomyza* sp. ( $n=18$ ); (D) Percent of plants with different levels of leaf damage from *Liriomyza* sp.

In summary, our results show that the transgenic common bean line Bt-22.5 can contribute with the management of the whitefly, along with other management tools, with potential to reduce the need of numerous insecticide sprays. The next step will be crossing the line Bt-22.5 with elite genotypes from the Embrapa common bean breeding program, to introduce the whitefly tolerance into common bean genotypes along with other desirable agronomic traits, such as high yield, grain quality and multiple virus resistance (BGMV, BCMV and CPMMV), as it was recently reported (Silva et al., 2022).

## Conclusion

Our results show the development of a stable transgenic common bean plant tolerant to the whitefly *B. tabaci* that can eventually be used as an additional management tool in Integrated

Pest Management (IPM). Plant-mediated silencing of the *B. tabaci* *vATPase* gene conferred a reasonable level of whitefly-tolerance to the transgenic common bean line. The transgenic plants did not show any other phenotypical difference, nor negative effects on the evaluated non-target insect species. This transgenic common bean event represents a sustainable pest management strategy that might contribute to avoid the intensive use of insecticides and to reduce environmental and financial costs.

## Data availability statement

The datasets generated for this study can be found in the Embrapa's research data repository, SIEXP [<https://www.siexp.cnptia.embrapa.br/siexp-mweb/>]. Transgenic seeds will be made available after the development and release of a new commercial cultivar.

## Author contributions

PP, JF, FA, AF, JB, LH, and TS contributed to the conception and design of the study. JF, AF, GC, MM, FA, PP, and EF conducted the genetic transformation assays and *in vitro* regeneration of transgenic plants. AF, AZ, JB, PP, and JS contributed to the conduction of the bioassays with insects. AF, FA, CP, and PP conducted the siRNA quantification assays. JS, AF, and PP performed the statistical analysis and elaborated graphs and figures. PP, FA, LH, and TS contributed with research grant funding application and management. AF wrote the first draft of the manuscript. PP wrote the final version of the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## Funding

This work was supported by Brazilian Agricultural Research Corporation – Embrapa (Grant nos. 20.18.03.035.00.00, 10.19.00.089.00.00.00, and 20.18.04.008.00.00). AF, MM, AZ, TS and FA are supported by the CNPq, the Brazilian Council for Scientific and Technological Development. The funders were not involved in the study design, collection, analysis, interpretation of data, the writing of this article or the decision to submit it for publication.

## Acknowledgments

The authors are grateful to Edson Djalma Dias Jacinto and Leandro Ribeiro de Matos for their technical support in the care with the colony of whiteflies and genetic transformation of plants. We also thank Rizia da Silva Andrade (BioGyn company, Goiania, GO, Brazil) for providing the starting parasitoids *Encarsia formosa* for our colony.

## References

- Alves-Freitas, D. M. T., Pinheiro-Lima, B., Faria, J. C., Lacorte, C., Ribeiro, S. G., and Melo, F. L. (2019). Double-stranded RNA high-throughput sequencing reveals a new Cytorthodovirus in a bean Golden mosaic virus-resistant common bean transgenic line. *Viruses* 11:10090. doi: 10.3390/v11010090
- Aragão, F. J. L., Barros, L. M. G., Brasileiro, A. C. M., Ribeiro, S. G., Smith, F. D., Sanford, J. C., et al. (1996). Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theoret. Appl. Genetics* 93-93, 142–150. doi: 10.1007/BF00225739
- Arias, C. A. A., Almeida, A. M. R., Mituti, T., Kitajima, E. W., Arias, C. A. A., Almeida, A. M. R., et al. (2015). Inheritance of tolerance to cowpea mild mottle virus in soybean. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 15, 132–138. doi: 10.1590/1984-70332015v15n3a24
- Bonfim, K., Faria, J. C., Nogueira, E. O. P. L., Mendes, É. A., and Aragão, F. J. L. (2007). RNAi-mediated resistance to bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *MPMI* 20, 717–726. doi: 10.1094/MPMI-20-6-0717
- Chen, W., Hasegawa, D. K., Kaur, N., Klot, A., Pinheiro, P. V., Luan, J., et al. (2016). The draft genome of whitefly *Bemisia tabaci* MEAM1, a global crop pest, provides novel insights into virus transmission, host adaptation, and insecticide resistance. *BMC Biol.* 14, 110. doi: 10.1186/s12915-016-0321-y
- De Barro, P. J., Liu, S.-S., Boykin, L. M., and Dinsdale, A. B. (2011). *Bemisia tabaci*: a statement of species status. *Annu. Rev. Entomol.* 56, 1–19. doi: 10.1146/annurev-ento-112408-085504
- De Clercq, J., Zambre, M., Van Montagu, M., Dillen, W., and Angenon, G. (2002). An optimized agrobacterium-mediated transformation procedure for *Phaseolus acutifolius* A. *Gray. Plant Cell Rep.* 21, 333–340. doi: 10.1007/s00299-002-0518-0

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## Supplementary material

The Supplementary material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2022.984804/full#supplementary-material>

### SUPPLEMENTARY FIGURE 1

Plasmid map displaying the organization of the whitefly *Bemisia tabaci* *vATPase* partial gene sequence cloned in sense and antisense, intercalated by intron 3 of the *malate synthase* gene of *Arabidopsis thaliana* for the production of siRNAs and the *Atahas* gene, with the complete promoter and terminator of *A. thaliana*, for the selection of transgenic plants, conferring resistance to the herbicide imazapyr.

### SUPPLEMENTARY TABLE S1

Agronomic traits of the transgenic common bean line 22.5 and the non-transgenic control line.

Dellaporta, S. L., Wood, J., and Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Report.* 1, 19–21. doi: 10.1007/BF02712670

Faria, J., Aragao, F. J. L., Souza, T. L. P. O., Quintela, E. D., Kitajima, E. W., and Ribeiro, S. G. (2016). Golden mosaic of common beans in Brazil: management with a transgenic approach. *APS Features*. doi: 10.1094/APSFeature-2016-10

Götz, M., Popovski, S., Kollenberg, M., Gorovits, R., Brown, J. K., Cicero, J. M., et al. (2012). Implication of *Bemisia tabaci* heat shock protein 70 in Begomovirus-whitefly interactions. *J. Virol.* 86, 13241–13252. doi: 10.1128/JVI.00880-12

Hasegawa, D. K., Chen, W., Zheng, Y., Kaur, N., Wintermantel, W. M., Simmons, A. M., et al. (2018). Comparative transcriptome analysis reveals networks of genes activated in the whitefly, *Bemisia tabaci* when fed on tomato plants infected with tomato yellow leaf curl virus. *Virology* 513, 52–64. doi: 10.1016/j.virol.2017.10.008

Hoshino, A., Sawada Buratto, J., Dias, B., Luski, P., and Androcio, H. (2017). Resistance of different common bean genotypes (*Phaseolus vulgaris* L.) to whitefly (*Bemisia tabaci* Gennadius, 1889) B biotype (Hemiptera: Aleyrodidae).

Ibrahim, A. B., Monteiro, T. R., Cabral, G. B., and Aragão, F. J. L. (2017). RNAi-mediated resistance to whitefly (*Bemisia tabaci*) in genetically engineered lettuce (*Lactuca sativa*). *Transgenic Res.* 26, 613–624. doi: 10.1007/s11248-017-0035-0

Jesus, F. G., Martins, B. C., Rocha, F. S., Boiça Junior, A. L., Carbonel, S. A. M., and Chiorato, A. F. (2021). Behavior of bean genotypes to attack by *BEMISIA TABACI*

- (GENN.) biotype b (Hemiptera: Aleyrodidae). *Arq. Inst. Biol.* 77, 635–641. doi: 10.1590/1808-1657v77p6352010
- Kanakala, S., Kontsedalov, S., Lebedev, G., and Ghanim, M. (2019). Plant-mediated silencing of the whitefly *Bemisia tabaci* Cyclophilin B and heat shock protein 70 impairs insect development and virus transmission. *Front. Physiol.* 10:557. doi: 10.3389/fphys.2019.00557
- Kaur, N., Chen, W., Zheng, Y., Hasegawa, D. K., Ling, K.-S., Fei, Z., et al. (2017). Transcriptome analysis of the whitefly, *Bemisia tabaci* MEAM1 during feeding on tomato infected with the crinivirus, tomato chlorosis virus, identifies a temporal shift in gene expression and differential regulation of novel orphan genes. *BMC Genomics* 18, 370. doi: 10.1186/s12864-017-3751-1
- Klein, T. M., Arentzen, R., Lewis, P. A., and Fitzpatrick-McElligott, S. (1992). Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. *Nat. Biotechnol.* 10, 286–291. doi: 10.1038/nbt0392-286
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25, 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Lu, D., Yue, H., Huang, L., Zhang, D., Zhang, Z., Zhang, Z., et al. (2021). Suppression of Bta11975, an  $\alpha$ -glucosidase, by RNA interference reduces transmission of tomato chlorosis virus by *Bemisia tabaci*. *Pest Manag. Sci.* 77, 5294–5303. doi: 10.1002/ps.6572
- Michel, A. P., Rouf Mian, M. A., Horacio Davila-Olivas, N., and Cañas, L. A. (2010). Detached leaf and whole plant assays for soybean aphid resistance: differential responses Among resistance sources and biotypes. *J. Econ. Entomol.* 103, 949–957. doi: 10.1603/EC09372
- Miller-Butler, M. A., Smith, B. J., Babiker, E. M., Kreiser, B. R., and Blythe, E. K. (2018). Comparison of whole plant and detached leaf screening techniques for identifying anthracnose resistance in strawberry plants. *Plant Dis.* 102, 2112–2119. doi: 10.1094/PDIS-08-17-1138-RE
- Pinheiro, P. V., Ghanim, M., Alexander, M., Rebelo, A. R., Santos, R. S., Orsburn, B. C., et al. (2017). Host plants indirectly influence plant virus transmission by altering gut cysteine protease activity of aphid vectors. *Mol. Cell. Proteomics* 16, S230–S243. doi: 10.1074/mcp.M116.063495
- Pinheiro-Lima, B., Pereira-Carvalho, R. C., Alves-Freitas, D. M. T., Kitajima, E. W., Vidal, A. H., Lacorte, C., et al. (2020). Transmission of the bean-associated Cytorhabdovirus by the whitefly *Bemisia tabaci* MEAM1. *Viruses* 12, 1028. doi: 10.3390/v12091028
- Pizetta, C. S. R., Ribeiro, W. R., Ferreira, A. L., da Costa Moura, M., Bonfim, K., Pinheiro, P. V., et al. (2021). RNA interference-mediated tolerance to whitefly (*Bemisia tabaci*) in genetically engineered tomato. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 148, 281–291. doi: 10.1007/s11240-021-02185-1
- Quezado-Duval, A. M., Nascimento, A. R., Pontes, N. C., Moita, A. W., Assunção, A., Golynski, A., et al. (2014). Desempenho de híbridos de tomate para processamento industrial em pressão de begomovirose e de mancha-bacteriana. *Hortic. Bras.* 32, 446–452. doi: 10.1590/S0102-053620140000400012
- R CORE TEAM (2019). A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Available at: <https://www.2016.R-project.org> (Accessed April 8, 2020).
- Russell, D. R., Wallace, K. M., Bathe, J. H., Martinell, B. J., and McCabe, D. E. (1993). Stable transformation of *Phaseolus vulgaris* via electric-discharge mediated particle acceleration. *Plant Cell Rep.* 12, 165–169. doi: 10.1007/BF00239099
- Sanford, J. C. (1990). Biolistic plant transformation. *Physiol. Plant.* 79, 206–209. doi: 10.1111/j.1399-3054.1990.tb05888.x
- Sani, I., Ismail, S. I., Abdullah, S., Jalinas, J., Jamian, S., and Saad, N. (2020). A review of the biology and control of whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), with special reference to biological control using Entomopathogenic fungi. *Insects* 11, 619. doi: 10.3390/insects11090619
- Sharma, H. C., Pampapathy, G., Dhillon, M. K., and Ridsdill-Smith, J. T. (2005). Detached leaf assay to screen for host plant resistance to *Helicoverpa armigera*. *J. Econ. Entomol.* 98, 568–576. doi: 10.1093/jee/98.2.568
- Silva, A. G., Boiça Junior, A. L., Farias, P. R. S., Rodrigues, N. E. L., De Souza, B. H. S., Bottega, D. B., et al. (2014). Non-preference for oviposition and antibiosis in bean cultivars to *Bemisia tabaci* biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae). *Revista Colombiana De Entomologia* 7, 7–14.
- Silva, A. G. D., Boiça, A. L., Farias, P. R. D. S., Souza, B. H. S. D., Rodrigues, N. E. L., and Carbonell, S. A. M. (2019). Common bean resistance expression to whitefly in winter and rainy seasons in Brazil. *Sci. Agric.* 76, 389–397. doi: 10.1590/1678-992X-2017-0434
- Silva, R. S., Faria, J. C., Knupp, A. M., Aguiar, M. S., Pereira, H. S., Ferreira, A. L., et al. (2022). Development and selection of transgenic advanced lines of carioca seeded common bean with multiple resistance to viruses. *Euphytica* 218:67. doi: 10.1007/s10681-022-03017-9
- Singh, K. B., and Weigand, S. (1994). Identification of resistant sources in *Cicer* species to *Liriomyza cicerina*. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 41, 75–79. doi: 10.1007/BF00053051
- Souza, T. L. P. O., Faria, J. C., Aragao, F. J. L., Del Peloso, M. J., Faria, L. C., Aguiar, M. S., et al. (2016). BRS FC401 RMD: cultivar de feijão carioca geneticamente modificada com resistência ao mosaico-dourado.
- Souza, T. L. P. O., Faria, J. C., Aragão, F. J. L., Peloso, M. J. D., Faria, L. C., Wendland, A., et al. (2018). Agronomic performance and yield stability of the RNA interference-based bean golden mosaic virus-resistant common bean. *Crop Sci.* 58, 579–591. doi: 10.2135/cropsci2017.06.0355
- Thakur, N., Upadhyay, S. K., Verma, P. C., Chandrashekar, K., Tuli, R., and Singh, P. K. (2014). Enhanced whitefly resistance in transgenic tobacco plants expressing double stranded RNA of v-ATPase A gene. *PLoS One* 9:e87235. doi: 10.1371/journal.pone.0087235
- Tinoco, M. L. P., Dias, B. B., Dall'Asta, R. C., Pamphile, J. A., and Aragão, F. J. (2010). In vivo trans-specific gene silencing in fungal cells by in planta expression of a double-stranded RNA. *BMC Biol.* 8, 27. doi: 10.1186/1741-7007-8-27
- Upadhyay, S. K., Chandrashekar, K., Thakur, N., Verma, P. C., Borgio, J. F., Singh, P. K., et al. (2011). RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route. *J. Biosci.* 36, 153–161. doi: 10.1007/s12038-011-9009-1
- Xia, J., Guo, Z., Yang, Z., Han, H., Wang, S., Xu, H., et al. (2021). Whitefly hijacks a plant detoxification gene that neutralizes plant toxins. *Cell* 184, 1693e.17–1705.e17. doi: 10.1016/j.cell.2021.02.014